



Einfluss von ADAM10, ADAM17, ADAM22 und ADAM23 auf neurale Differenzierungsvorgänge

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Annett Markus, geb. in Halle

aus Rostock

Rostock, 2011

Dekan: Prof. Dr. Guido Dehnhardt

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Arndt Rolfs, Universität Rostock

Direktor des Albrecht Kossel Institutes für Neuroregeneration

2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter G. Weiss, Universität Rostock,

Institut für Zellbiologie und Biosystemtechnik,

Direktor der Abteilung Tierphysiologie

3. Gutachter: PD Dr. med. Jiankai Luo, Universität Rostock,

Albrecht Kossel Institutes für Neuroregeneration

Datum der Verteidigung: 21.11.2011

**Meinen Eltern,
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.**

Felix qui potuit rerum cognoscere causas.

(Vergil)

Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen	I
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	6
1.1 Neuroregenerative Prozesse	6
1.2 ADAM - Proteine.....	8
1.3 Zielstellung	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Material	13
2.1.1 Technische Geräte	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.3 Software	15
2.1.4 Chemikalien.....	15
2.1.5 Zellen und Gewebe.....	19
2.1.6 Antikörper	20
2.1.7 Oligonukleotide.....	21
2.1.8 Vektoren	23
2.1.9 Enzyme und andere Proteine.....	23
2.1.10 Kits	23
2.2 Mikrobielle Methoden	24
2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	24
2.2.2 Präparation von Ca^{2+} kompetenten Zellen	24
2.2.3 Transformation von Ca^{2+} kompetenten Zellen.....	24
2.3 Zellbiologische Methoden	25
2.3.1 Messung der Zellzahl.....	25
2.3.2 Beschichtung von Plastik Kulturschalen	25
2.3.3 Kultivierung und Differenzierung von ReNcell VM Zellen	25
2.3.4 Kultivierung und Differenzierung von ST14A Zellen	26
2.3.5 Kultivierung von Embryonen	27
2.3.6 Transfektion von ReNcell VM Zellen	27
2.3.7 Transfektion von Embryonen	28
2.4 Molekularbiologische Methoden	28

2.4.1	Isolation von Vektor DNA.....	28
2.4.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.4.3	Isolierung von DNA und PCR-Fragmenten	29
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.4.6	Polymerase Kettenreaktion.....	31
2.4.7	Aufreinigung von Gesamt-RNA.....	32
2.4.8	Microarray.....	32
2.4.9	cDNA Synthese	33
2.4.10	Quantitative Real-Time RT PCR	33
2.4.11	Photometrische DNA/RNA Konzentrationsmessung	34
2.4.12	DNA Sequenzierung	34
2.5	Proteinchemische Methoden	35
2.5.1	Lyse von Zellen und Gewebe.....	35
2.5.2	Proteinbestimmung.....	35
2.5.3	SDS- Acrylamid- Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	36
2.5.4	Coomassie-Färbung von Proteinen (Weber und Osborn, 1969).....	36
2.5.5	Western Blot	36
2.5.6	FACS Analyse	37
2.5.7	Immunozytochemie und Immunohistochemie	38
2.5.8	Axonmessung.....	39
2.5.9	Apoptosemessung	40
2.5.10	Statistik.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Untersuchung des <i>in vitro</i> Systems.....	41
3.1.1	Analyse von ADAM10	41
3.1.2	Analyse von ADAM17	44
3.1.3	Analyse von ADAM22	46
3.1.4	Analyse von ADAM23	48
3.2	Endogene Expressionsanalyse in Hühnerembryonen.....	52
3.2.1	Charakterisierung der Antikörper	52
3.2.2	Endogene ADAM - Proteinexpression während der Embryonalentwicklung	53
3.3	Analyse von ST14A Zellen	59
3.4	Analyse von transfizierten Hühnerembryonen	60
3.5	Genexpressionsanalyse nach ADAM23 - Transfektion	62
4	Diskussion	67
4.1	Einfluss von ADAM10 auf die Differenzierung	67

4.2 Einfluss von ADAM17 auf die Differenzierung	69
4.3 Einfluss von ADAM22 auf die Differenzierung	71
4.4 Einfluss von ADAM23 auf die Differenzierung	72
5 Zusammenfassung	77
6 Ausblick.....	79
7 Literatur	80
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	88
9 Anhang	91

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calf serum
g	Gramm (Menge)
h	Stunde
H ₂ O _{bidest.}	bidestilliertes Wasser
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HSA	Human serum albumin
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (Konzentration), Marker
m	Milli
min	Minute
mol	Stoffmenge
NGS	Normal goat serum

N-terminal	am Aminoterminus, aminoendständiger Aminosäurerest
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RIPA	radioimmunoprecipitation buffer
RT	Raumtemperatur
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SOC	Komplexmedium
t [h]	Zeit [Stunden]
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse (weight) / Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Neuroregenerative Prozesse

Nach einem griechischen Mythos wird der Halbgott Prometheus, der den Menschen das Tierfleisch als Nahrung und das Feuer zum Garen gebracht hatte, aus Rache von Zeus in Ketten gelegt und an einen Felsen geschmiedet. Jeden Morgen fraß ein Adler die Hälfte seiner Leber. Bereits am nächsten Morgen war die Leber komplett nach gewachsen.

Dieser Mythos beschreibt den Traum der Menschen, die Schäden, welche durch Verletzungen und Krankheiten entstehen, zu reparieren. Forschungen über die Regeneration gibt es in vielen Bereichen der Medizin. Der Bereich Neuroregeneration beschäftigt sich mit der Reparatur und dem Nachwachsen von Nervenzellen und Nervengewebe. Dabei steht die Entstehung von Nervenzellen, Gliazellen, Axonen und Synapsen im Vordergrund.

Der Mensch besitzt etwa 30 Milliarden Nervenzellen, wobei einige im Laufe des Lebens absterben. Lange Zeit gingen Forscher davon aus, dass sich Nervenzellen nicht mehr regenerieren können. Jährlich sind etwa 90.000 Menschen von Verletzungen im Nervensystem betroffen (Stabenfeldt et al. 2006). Obgleich humane Axone Wachstumsraten von 2 bis 5 mm pro Tag erreichen können (Recknor et al. 2006; Mifsumoto, 1985), nimmt die Fähigkeit der Zellteilung von Vorläuferzellen kontinuierlich mit steigendem Alter ab (Kuhn et al 2001). Dies führt dazu, dass der Körper weniger neue Nervenzellen bilden kann. Des Weiteren lagern sich um verletzte Gebiete vermehrt reaktive Astrozyten an, welche u. a. zu einer Hochregulation des Moleküls CS-4,6 führen. Dieser Prozess inhibiert das Wachstum neuronaler Ausläufer (Gilbert et al. 2005). Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit dem Thema Nervenwachstum, um das Problem der unzureichenden endogenen Regeneration zu lösen. Flynn et al. (2009) zeigte, dass der Actin-Transport an den Wachstumskegeln aktiv das Axonwachstum begünstigt. Neben dem Axonwachstum wurde herausgefunden, dass differenzierte Neurone ihre Fähigkeit behalten, aus Axonen Dendriten zu erzeugen (Bradke et al. 2000). Weiterhin gibt es auch Proteine, welche verantwortlich für ein gesundes Wachstum von Ner-

venzellen sind. So führt zum Beispiel die Abwesenheit von NGF (Nerve Growth Factor) in Nervenzellen zu ihrer Apoptose (Freeman et al. 2004). Darüber hinaus haben Neurowissenschaftler in zwei Gehirnregionen, dem Riechhirn und dem Hippocampus, Vorläuferzellen entdeckt, die sich möglicherweise auch beim Menschen in Nervenzellen differenzieren können (Johannson et al. 1999). Ob sich jedoch die neu gebildeten Neuronen mit den bereits vorhandenen Zellen verschalten und mit ihnen kommunizieren, bleibt jedoch fraglich.

Diese Beispiele zeigen, dass die Regeneration von Nervenzellen möglich ist. Trotzdem sind diesem Wiederaufbau auch Grenzen gesetzt. Solche Grenzen möchte der Mensch jedoch überwinden. Interessant für den Menschen ist in diesem Zusammenhang ein Vertreter aus der Tierwelt. So verfügt beispielsweise der Axolotl, ein aquatil lebender mexikanischer Schwanzlurch, über die Fähigkeit, Gliedmaßen, Organe und sogar Teile des Gehirns und des Herzens zu regenerieren. Die Regenerate sind dabei keine Verkrüppelungen, sondern vollständig und funktionstüchtig (Menger et al. 2010).

Bei vielen Experimenten zum Thema Neuroregeneration wurden Tiermodelle untersucht, welche zwar Hinweise auf die Funktionsweise des menschlichen Nervensystems geben, aber nicht immer zu hundert Prozent übertragbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Modell des humanen *in vitro* Systems der ReNcell VM Zellen genutzt. Dies ist eine immortalisierte neuronale Vorläuferzelllinie, die in der Lage ist, sich in Neurone und Gliazellen zu differenzieren. Die Linie wurde aus der Mesencephalonregion eines 10 Wochen alten fötalen Gehirns gewonnen (Donato et al. 2007) und besitzt eine Verdopplungszeit von 20 bis 30 Stunden (Schmöle et al. 2010). Mit diesem System kann man erforschen, welchen Einfluss verschiedene Proteine auf die Differenzierung von Stammzellen zu Neuronen haben. Die Differenzierung dieser Zelllinie in Neurone wird unter anderem von Wnt3a (Hübner et al. 2010) positiv beeinflusst. Auch können diese Zellen zu dopaminerge Neuronen differenzieren und wurden auch erfolgreich auf Rattengewebe transplantiert (Morgan et al. 2009).

Verschiedene Untersuchungen an Mäusen verweisen auf sogenannte ADAM - Proteine, welche Effekte auf die neuronale Entwicklung haben sollen (Sagane et al. 1998, Blobel CP

2002, Yang et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte von verschiedenen ADAM – Proteinen auf die humane neuronale Vorläuferzelllinie erforscht werden.

1.2 ADAM - Proteine

Von bisher 35 bekannten ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) - Proteinen haben mindestens 17 Proteine Funktionen im Nervensystem. Mitglieder der ADAM – Familie sind Transmembranproteine vom Typ I, welche unterschiedliche Domänen enthalten.

Diese Domänen sind die Prodomäne, Metalloproteasendomäne, Disintegrindomäne, cysteinreiche Domäne, EGF-ähnliche Domäne, Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne (Wolfsberg et al. 1995; Black and White, 1998; Schlondorff and Blobel, 1999).

Durch einen Cytseinschalter hält die Prodomäne die Metalloprotease im Protein inaktiv und sorgt gleichzeitig als Chaperon für die Faltung der ADAM Proteine.

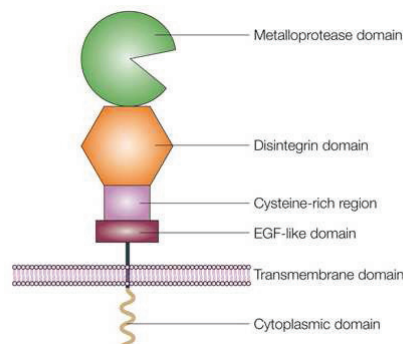


Abb. 1: ADAM-Domänenstruktur (Nature 2005, Blobel)

ADAM-Proteine bestehen aus verschiedenen Domänen, welche unterschiedliche Funktionen auf die Zelle haben. In diesem Zusammenhang sorgt die Metalloproteasendomäne für eine proteolytische Aktivität der ADAM-Proteine gegenüber von anderen Membranproteinen, während die Cystenreiche und EGF-ähnliche Domäne an der Zelladhäsion beteiligt sind. Die Disintegrindomäne spielt eine Rolle in der Interaktion mit anderen Integrinen, wohingegen die zytoplasmatische Domäne bei der interzellulären Signalweiterleitung mitwirkt.

In einem Teil der Metalloproteasendomäne haben viele ADAMs eine konservierte Sequenz, welche an ein Zinkion bindet, was zu einer Funktion als aktive Protease führt. Diese proteolytische Aktivität ist bekannt für ADAM1, 8-10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30 und 33 (Edwards et al. 2008). Die Disintegrindomäne ist an Interaktionen mit Integrinen beteiligt, obwohl viele ADAM-Proteine die Arg-Gly-Asp Sequenz nicht enthalten, welche in vielen anderen Integrinliganden enthalten sind (Seals und Courtneidge, 2003; White, 2003). Die cysteinreiche Domäne und die EGF-ähnliche Domäne sind in der Adhäsion beteiligt. So spielen sie zum

Beispiel eine Rolle durch Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen und Zelladhäsionsmolekülen. Die zytoplasmatische Domäne ist in ihre Länge und Sequenz sehr variabel und spielt eine Rolle in der interzellulären Signalweiterleitung (Wolfsberg et al, 1995; Duffy et al., 2003; Seals und Courtneidge, 2003; White, 2003; Blobel, 2005).

ADAM-Proteine sind wichtig in der Embryogenese und Gewebeformation (Yang et al. 2006; Edwards et al. 2008; Alfandari et al. 2009; Neuner et al. 2009). So führt zum Beispiel das Fehlen der Proteine ADAM10, ADAM17 und ADAM19 zum Sterben bei Mäusen durch kardiovaskuläre Defekte und Gehirndefekte in embryonalen Stadien oder bei der Geburt (Hartmann et al. 2002; Horiuchi et al. 2005). ADAM22 oder ADAM23 Mausmutanten zeigen Ataxia und Hypomyelination von peripheren Nerven oder weisen ein Tremor auf (Leighton et al. 2001; Sagane et al. 2005).

Während der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) werden ADAM-Proteine deutlich in verschiedenen anatomischen Strukturen exprimiert und spielen eine Schlüsselrolle in der neuronalen Proliferation und Differenzierung sowie in Zellmigration, Synaptogenese, Axonwachstum und Axonführung (Yang et al. 2006; Edwards et al. 2008; Alfandari et al. 2009). So werden verschiedene Mitglieder der Proteinfamilie (z.B. ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM17, ADAM22 und ADAM23) lokal und temporär in dem sich entwickelnden Hühnergehirn und dem Rückenmark deutlich reguliert (Lin et al. 2008, 2010).

ADAM10 spielt eine Rolle in der Regulation der Axonwachstumskegel und dem Axonwachstum sowie bei der Kontrolle der Neurogenese während der Entwicklung (Hattori et al. 2000, Schimmelpfeng et al. 2001, Fambrough et al. 1996, Rooke et al. 1996, Chen et al. 2007). Auch ist ADAM10 für die spätere Entwicklung von Nervengewebe verantwortlich (Hatta et al. 1987). So kann ADAM10 neben frühen Neuronen auch von Oligodendrozyten in späteren embryonalen Stadien und auch von Astrozyten produziert werden (Lin et al. 2008, Kieseier et al. 2003).

Des Weiteren zeigen ADAM10 - defiziente Mäuse starke Entwicklungsdefekte während der Neurogenese (Hartmann et al. 2002). Das Notch-Protein, welches für den neurogenen Phänotyp verantwortlich ist, kann auch von ADAM10 gespalten werden (Pan et al. 1997). Neben

verschiedenen anderen Proteinen zählen die Wachstumsfaktoren wie Betacellulin, EGF und HB-EGF zu den ADAM10 Substraten (Sahin et al. 2004). Die in der Literatur beschriebenen starken Effekte von ADAM10 könnten bei der Entwicklung von menschlichen Zellen auch eine bedeutende Rolle spielen.

ADAM17, auch TACE (tumor necrosis factor alpha converting enzyme) genannt, ist bekannt dafür, dass es TNF- α und TGF- α spaltet (Black 2002, Zheng et al. 2004, Kenny et al. 2007, Le Gall et al. 2009). Ebenso spielt ADAM17 durch die Bearbeitung von Amphiregulin eine Rolle in der Aktivierung des Strom - EGF (Sternlicht et al. 2008). In T4-2 Zellen ist es durch seine spaltenden Eigenschaften auch für die Zellproliferation verantwortlich (Kenny et al. 2007). Zusätzlich aktiviert ADAM17 den EGF-Rezeptor durch das Spalten von TNF- α und beeinflusst somit auch Zellwachstum, Proliferation und Zellmigration (Shah et al. 2006, Lautrette et al. 2005). Auch hat ADAM17 durch das Spalten des Zelladhäsionsmoleküls L-Selektin einen Einfluss auf die Zelladhäsion (Li et al. 2006). Der in der Literatur beschriebene Einfluss auf die Proliferation und Zelladhäsion könnte u. a. einen Effekt auf die Differenzierung von humanen Vorläuferzellen besitzen.

Die Sequenz von ADAM22 ist fast identisch wie die Sequenz von ADAM11 und ADAM23 und wird sehr stark im Gehirn von Nagetieren exprimiert (Sagane et al. 1998). Wie das Protein ADAM23 besitzt ADAM22 keine Metalloproteasendomäne und ist somit nicht proteolytisch aktiv. ADAM22 interagiert u. a. mit dem 14-3-3 ζ Protein, welches für die Zelladhäsion und die Zellausbreitung verantwortlich ist (Zhu et al. 2005). Des Weiteren ist ADAM22 wichtig für die Funktion des Nerven Systems (Yan et al. 2006). ADAM22 interagiert unter anderen auch mit DLG4 (auch PSD-95 genannt), welches ein Protein in der Postsynapse ist. In diesem Zusammenhang ist ADAM22 auch an der Regulation der synaptischen Übertragung beteiligt (Fukata et al. 2006). Die in der Literatur beschriebenen Effekte von ADAM22 auf die synaptische Übertragung und das Zellwachstum könnten auch während der humanen Differenzierung von Vorläuferzellen eine wichtige Rolle spielen.

ADAM23 ist genauso essentiell für eine normale Gehirnentwicklung und die korrekte Funktion des Nervensystems (Sagane et al. 1998, Yang et al. 2006). In embryonalen Mauskarzi-

nomzellen (P19 Zellen) wird das Protein während der Differenzierung der Zellen nahe der Neuriten produziert (Sun et al. 2007). ADAM23-defiziente Mäuse zeigen Tremor, starke Ataxia und sterben innerhalb von 2 Wochen nach der Geburt (Lighton et al. 2001). Durch die Interaktion mit $\alpha\beta 3$ Integrin fördert ADAM23 u. a. auch die Zelladhäsion (Cal et al. 2000). Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass ADAM23 einen Tumor unterdrücken kann (Takada et al. 2005). Die u. a. in Mauszellen beschriebenen Effekte auf die neuronale Differenzierung könnten auch in den humanen neuronalen Vorläuferzellen eine Rolle spielen. Somit könnte ADAM23 nicht nur einen Einfluss auf die Differenzierung an sich, sondern auch auf die axonale Differenzierung von humanen Zellen haben.

1.3 Zielstellung

Wie wirken ADAM-Proteine in den Zellen? Von den 35 bisher bekannten ADAM-Proteinen haben mindestens 17 Proteine Funktionen im Nervensystem (Blobel, 2005). Ziel dieser Arbeit war es zu analysieren, welchen Einfluss vier verschiedene ADAM-Proteine auf die Differenzierung und Entwicklung von Stammzellen zu Neuronen haben. Die anhand der Literatur ausgewählten Proteine waren ADAM10, ADAM17, ADAM22 und ADAM23. Zur Erforschung dieser Proteine sollten verschiedene zellbiologische, molekularbiologische und proteinchemische Methoden verwendet werden.

Als vorrangiges Modell sollte das humane *in vitro* System der Zelllinie ReNcell VM für die Untersuchungen genutzt werden. Die Zellen sollten mit den verschiedenen Vektoren zur Proteininduktion bzw. –repression transfiziert und anschließend sowohl proliferiert als auch differenziert werden.

Neben dem *in vitro* System der ReNcell VM Zellen sollte auch untersucht werden, in wieweit die Proteine ADAM10, ADAM17, ADAM22 und ADAM23 während der Entwicklung in einem *in vivo* System auftreten, um weitere Erkenntnisse über die Rolle während Entwicklung zu erhalten. Hierfür sollten Hühnerembryonen zu einem späteren Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung verwendet werden, da hier vermehrt die Differenzierung der Zellen stattfindet (Zamenhof et al. 1978).

Es sollte erforscht werden, ob ADAM10, wie in der Literatur beschrieben, eine Rolle in der Entwicklung von Nervengewebe spielt (Hatta et al. 1987) und sich somit positiv auf die Differenzierung der ReNcell VM Zellen zu Nervenzellen auswirkt.

Des Weiteren war es das Ziel zu untersuchen, ob ADAM17 auch in humanen neuronalen Vorläuferzellen Auswirkungen im Bereich des Zellwachstums und der Proliferation hat (Shah et al. 2006, Laurette et al. 2005). Hierfür sollte das Protein in den Zellen hoch- und herunterreguliert werden, um die Funktion in der Zelllinie genauer beschreiben zu können.

In der Literatur wurde beschrieben, dass sowohl ADAM22 als auch ADAM23 für eine normale Gehirnentwicklung bei Mäusen verantwortlich sind (Sagane et al. 1998, Yang et al. 2006). Ausgehend von diesen Veröffentlichungen war es Gegenstand in der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, ob eine Stimulaion bzw. Repression der ADAM - Proteine zu einer verbesserten Differenzierung der Vorläuferzellen in Nervenzellen führt.

Da ebenfalls beschrieben wurde, dass ADAM23 während der Differenzierung von P19 Zellen nahe der Neuriten auftritt (Sun et al. 2007), sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob ADAM23 einen positiven Einfluss auf die Entwicklung von axonalen Ausläufern hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Mikroskopie

Kamera	DS2M	Nikon
Zellkulturmikroskope	Eclipse TS100	Nikon
Fluoreszenzmikroskope	Biozero	Keyence

Elektrophorese

Agarose Gelkammer	Mini-SubII	Bio-Rad
Geldokumentationssystem	Transilluminator	Herolab
Geldokumentationskamera	C-5050	Olympus
Stromgerät	PowerPacHC	Bio-Rad
SDS-PAGE Kammer	Criterion	Bio-Rad
Semi-dry Transferkammer	Trans-Blot SD	Bio-Rad

Zellkultur

Zellzähler	CASY	Innovatis
Inkubator		Binder
Sterile Arbeitsbench	Antares 48	Sterile

Zentrifugen

Zentrifugen	Z383K	Hermle
	Z233MK-2	Hermle
	Universal 30 RF	Hettich

Verschiedenes

Waage	MCBA 100	Sartorius
FACS	FACSCalibur	Becton Dickenson
Heizblock	Thermomixer	eppendorf
Inkubator	T6	Heraeus
Nucleofector	Nucleofector II	Amaxa
pH-Meter		Mettler Toledo
PCR-Cycler	GeneAmp9700	ABI
Pipetten	reference	eppendorf
Plattenleser	Magellan	Tecan
Real-Time PCR Cycler	LightCycler 1.5	Roche
Schüttler	KM-2Akku	Edmund Bühler
	K2-50	Noctua
Spekrophotometer	Ultrospec3100pro	Amersham
	Nano-Drop	ThermoScientific
Thermoschüttler	PST-60HL-4	Lab-4-You
Vortexer	MS1	IKA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Spatel		VWR
Bakterien Kulturgefäße	15 ml	Falcon
Bakterien Kulturplatten	9 cm	Greiner
Zellkultur Pipetten	5,10, 25 ml	Greiner
Zellkultur Plastschalen	48-,24-,6-well,T-75	Greiner
Chamber Slides	8-well	Falcon
FACS Röhrchen	5 ml	Falcon
Handschuhe	nitrile	Kimberly-Clark
LightCycler Kapillaren		Roche

Nitrozellulosemembran	Hybond-ECL	Amersham
PCR Reaktionsgefäße	0.2 ml	Biozym
Pipettenspitzen	10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Biozym
Reaktionsgefäße	1.5 ml	Eppendorf/Sarstedt
	15, 50 ml	Falcon
Sterile Filter	0.22 µM	Millipore
Whatman Papier	58x58 cm	Schleicher und Schüll

2.1.3 Software

Adobe Photoshop 6.0

ArgusX1

BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

CellQuest Pro (BD Biosciences)

CorelDraw 11

ExPASy (http://expasy.org/tools/pi_tool.html)

Microsoft Office 2003

Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>)

Vector NTI Advance 10.0

NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Ensembl genome browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)

2.1.4 Chemikalien

Alle zur Ausführung der Versuche verwendeten Chemikalien lieferten, falls nicht anders erwähnt, die Firmen Calbiochem, Fluka, Merck, Sigma oder Roth.

Medium Bakterien

Zur Selektion von veränderten Bakterienstämmen wurden nach dem Autoklavieren des Mediums Antibiotika mit einer Konzentration von 1:1000 aus der Antikörperstocklösung dem Medium zugesetzt.

LB-Medium	15 g/l H ₂ O, autoklaviert
LB-Agar	25 g/l H ₂ O, autoklaviert
Ampicilin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml

Gel-Elektrophoresepuffer

6x DNA loading dye	MBI fermentas
Agarose	Bio-Rad
50x TAE	2 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA
10x Formaldehyd Gelpuffer	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7.0
1x Formaldehyd Gellaufpuffer	10 % 10x Formaldehyd Gelpuffer, 2 % 37% (12.3 M) Formaldehyd

Medium Zellkultur

B27	Invitrogen
Benzonase	Merck
bFGF	Roche
DMEM 4.5 g/l glucose	Invitrogen
DMEM/F12	Invitrogen
EGF	Roche
FCS	Invitrogen

Gentamycin	Invitrogen
HBSS	Invitrogen
Heparin Natriumsalz	Invitrogen
HSA	Invitrogen
mouse laminin	Trevigen
PBS	Biochrom AG
Pen/Strep 100x	PAA
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Trypsin/Benzonase Lösung	25 U/ml Benzonase in Trypsin-EDTA
Trypsin-Inhibitor/Benzonase	1 % HSA , 25 U/ml Benzonase, 0.55 mg/ml trypsin-inhibitor in DMEM/F12
Medium ST14A	DMEM 4.5 g/l glucose, 10 % FCS, 1x Pen/Strep
Proliferationsmedium ReNcell VM	DMEM/F12, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, 2 mM Glutamax, 1xB27, 10 U/ml Heparin Natriumsalz, 50 µg/ml Gentamycin
Differenzierungsmedium ReNcell VM	DMEM/F12, 2 mM Glutamax, 1xB27, 10 U/ml Heparin Natriumsalz, 50 µg/ml Gen- tamycin

Lysepuffer für Zellextraktion

RIPA Puffer	20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.1 % Natriumdeoxycholat, 1 % Triton X-100, 10 % Glycerin, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Natriumpyrophos- phate plus Protease und Phosphatase Inhi- bitor Cocktail (Roche)
-------------	---

Lösungen für Western Blot

5x Probepuffer	50 mM Tris, 2 % SDS, 5 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 0.2 mg/ml Bromphenolblau
10x SDS-Elektrophoresepuffer	250 mM Tris, 188 mM Glycin, 3.5 mM SDS
SDS Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 3.5 mM SDS, 20 % Methanol
Blocklösung	TBST mit 3 % Skim-Milchpulver
TBS	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6
TBST	TBS mit 0.1 % Tween 20

Lösungen für FACS-Analyse, Immunozyto- und Immunohistochemie

PBS (w/o Mg, Ca)	Biochrom
FACS Fixierlösung	1 % PFA in PBS
FACS Saponinpuffer	0.5 % BSA, 0.5 % saponin, 0.02 % NaN_3 in PBS
FACS Waschpuffer	0.5 % BSA, 0.02 % NaN_3 in PBS
IZ Blockpuffer	5 % NGS, 0.3 % Triton-X100 in PBS
IZ Antikörper-Inkubationspuffer	1 % NGS in PBS
IH Blockpuffer	5 % Milchpulver, 5 % NGS, 0.05 % TritonX-100 in TBS
IH Antikörper-Inkubationspuffer	5 % Milchpulver, 5 % NGS in TBS
Mountingmedium mit DAPI	VectaShield
HBS-Puffer	20 mM Hepes, 150 mM NaCl

2.1.5 Zellen und Gewebe

Prokaryotische Zelllinien

Für die Vektorkonstruktion und Vervielfältigung von vorhandenen Vektoren wurde der vom *E. coli* Bakterium K12 abgeleitete Bakterienstamm JM109 mit dem Genotyp $e14-(mcrA-)$ *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* ($r_K^- m_K^+$) *supE44 relA1* $\Delta(lac-proAB)$ [F' *traD36 proAB lacI^qZ* $\Delta M15$] (Promega) verwendet.

Eukariotische Zelllinien

Als Untersuchungsmodell dienten einerseits ReNcell VM Zellen (humane neurale Vorläuferzellen des ventralen Mittelhirns eines 10 Wochen alten Fetus, v-Myc immortalisiert) von ReNeuron/Millipore und andererseits ST14A Zellen (Ratten Striatum primordia, embryonischer Tag 14) , welche als *in vitro* Vergleich zu den *in vivo* Experimenten mit Hühnerembryonen genutzt wurden.

In vivo Gewebe

Für das *in vivo* Untersuchungsmodell wurden befruchtete Hühnereier von der Rasse White Leghorn Hühner (*Gallus gallus domesticus*) aus einer regionalen Farm geliefert. Diese wurden dann weiter bebrütet und die daraus entstandenen Embryonen wurden für *in vivo* Experimente verwendet.

2.1.6 Antikörper

Antikörper wurden für FACS Analyse, Immunozyto-, Immunohistochemie und Western Blots verwendet.

Tab. 1: Primärantikörper

Antikörper	Typ	Firma	Verwendung	Verdünnung
β-actin	mouse monoclonal IgG ₁	Sigma (AC-15)	WB	1:10.000
Beta-III-Tubulin	mouse monoclonal IgG ₁	Santa Cruz (sc-51670)	FACS IC	1:100 1:500
β-catenin	mouse monoclonal IgG1	Santa Cruz (sc-7963)	WB	1:10.000
GAPDH	mouse monoclonal IgG1	Abcam (ab8245)	WB	1:5000
GAPDH	rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz (FL-335)	WB	1:1000
GFAP	rabbit polyclonal IgG	Dako (Z0334)	FACS, IC	1:500
HuC/D	mouse monoclonal IgG ₁	Invitrogen (A-21271)	FACS	1:100
S100	rabbit polyclonal IgG	Dako (Z0311)	FACS, IC	1:500
Negativkontrolle	mouse IgG	Santa Cruz (sc-2025)	FACS, IC	1:100
Negativkontrolle	rabbit IgG	Santa Cruz (sc-2027)	FACS, IC	1:100

Abkürzungen:

WB	Western Blot
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
IC	Immunocytochemistry

Tab. 2: Sekundärantikörper

Antikörper	Host	Konjugat	Firma	Verwendung	Verdünnung
rabbit IgG	goat	Alexa Fluor 680	Invitrogen (A-21076)	WB	1:10.000
mouse IgG	goat	Alexa Fluor 680	Invitrogen (A-21057)	WB	1:10.000
rabbit IgG	goat	IRDye 800	Rockland (611131122)	WB	1:10.000
mouse IgG	goat	IRDye 800	Rockland (610131003)	WB	1:10.000
mouse IgG	goat	Alexa Fluor 488	Invitrogen (A11029)	FACS, IC	1:1000
rabbit IgG	goat	Alexa Fluor 568	Invitrogen (633194)	IC	1:1000
rabbit IgG	goat	Alexa Fluor 647	Invitrogen (A21245)	FACS	1:1000
mouse IgG	goat	Alexa Fluor 568	Invitrogen (55403A)	IC	1:1000

Abkürzungen:

WB Western Blot
 FACS Fluorescence Activated Cell Sorting
 IC Immunocytochemistry

2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotidensequenzen wurden mit dem OligoPerfect online tool (Invitrogen) beziehungsweise PerlPrimer konstruiert und von der MWG Biotech AG hergestellt. Die Stocklösungen der Primer (100 µM) wurden bei -20 °C gelagert.

Tab. 3: Oligonucleotide für Sequenzierung

Name	Zweck	Sequenz 5'-3'
T7_fw	Sequenzierung von pcDNA3.1/HisA / pGEM-T easy	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6_rev	Sequenzierung von pcDNA3.1/HisA / pGEM-T easy	ATTTAGGTGACACTATAG
pCAGGS-fw	Sequenzierung von pCAGGS	TTCCTACAGCTCCTGGGCAACG

Fortsetzung Tab. 3

Name	Zweck	Sequenz 5'-3'
pCAGGS-rev	Sequenzierung von pCAGGS	TCAGATGCTCAAGGGGCTTC
pG-Shin2-fw	Sequenzierung von pG-Shin2	ACACCCTAACTGACACACAT
pG-Shin2-rev	Sequenzierung von pG-Shin2	ACTGATCTTCAGCATCTT

Tab. 4: Oligonucleotide für Klonierung
 Annealingtemperatur für alle Primer war 62 °C.

Targetname	Zweck	Forward Primer Sequenz 5'-3' Reverse Primer Sequenz 5'-3'
ADAM10	ADAM10 in pCAGGS	FW: CGGCTCGAGGAAGATGGTGGTGGCTGAGAGTGTT
		RV: CGGCTCGAGTTAGCGTCTCATGTGTCCCATTG
ADAM10	ADAM10 in pG-Shin2	FW: GATCCCCGCGATTGATACAATTTACCTTCAAGA GAGGTAAATTGTATCAATCGCTTTTT
		RV: AGCTAAAAAGCGATTGATACAATTTACCTCTCTT GAAGGTAAATTGTATCAATCGCGGG
ADAM17	ADAM17 in pCAGGS	FW: GGAATTCCATGAGGCAGTCTCTCTATTCC
		RV: GGAATTCTTAGCACTCTGTTTCTTTGCTGTC
ADAM17	ADAM17 in pG-Shin2	FW: GATCCCCGAATACAGATAGAGCAGAT TTCAAGA GAATCTGCTCTATCTGTATTC TTTT
		RV: AGCTAAAAAGAATACAGATAGAGCAGATTCTCTT GAAATCTGCTCTATCTGTATTCGGG
ADAM22	ADAM22 in pCAGGS	FW: ATGATACTGCACTTGACAG
		RV: CTAAATGGAAGTCTCTA
ADAM23	ADAM23 in pCAGGS	FW: ATGCCGCAGAAAGACTACAA
		RV: TTAATAAGCCCCATCCTG
ADAM23	ADAM23 in pG-Shin2	FW: GATCCCCGGATCAGATTGACATCACCTTCAAGA GAGGTGATGTCAATCTGATCCTTTTT
		RV: AGCTAAAAAGGATCAGATTGACATCACCTCTCTT GAAGGTGATGTCAATCTGATCCGGG

2.1.8 Vektoren

Tab. 5: Klonierungs-, Reportervektoren

Name	Insert/ Größe [bp]	Eigenschaften	Referenz
pGEM-T easy	3015	cloning vector, blue/white screening	Promega
pmaxGFP	3486	P _{CMV} , maxGFP	Amara
pCAGGS	4790	P _{CAG}	J. Luo
pCAGGS-GFP	723/5534	mutGFP, P _{CAG}	J. Luo
PG-Shin2	3787	Human H1 promoter	J. Luo

Abkürzungen:

CAG chicken β -actin Promoter
h human
m mouse
P promoter

2.1.9 Enzyme und andere Proteine

Enzyme (Polymerasen, Restriction Enzyme, Ligasen, Phosphatasen) lieferten die Firmen Promega, New England Biolabs, MBI Fermentas, Stratagene und Qiagen.

2.1.10 Kits

Endo-Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen
FastLane cDNA Kit	Qiagen
GFX purification Kit	GE healthcare
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen
ZYPPY Plasmid Mini Kit	Zymogen

2.2 Mikrobielle Methoden

2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde bei 37°C in einem Schüttler bei 150 - 250 rpm mit LB-Medium inklusive Antibiotika in einem Erlenmeyerkolben beziehungsweise einem 15 ml Reaktionsgefäß kultiviert. Zur Lagerung von Bakterienklonen wurde 1 ml der Kultur mit 0.2 ml Glyzerin vermischt und bei -80°C gelagert. Für neue Kulturen wurde ein Teil der Glyzerinkultur mit 5 ml frischem LB-Medium mit Antibiotika bei 37°C überimpft.

2.2.2 Präparation von Ca^{2+} kompetenten Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Kalziumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970). Die Transformation selbst wurde nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Eine Vorkultur (2 ml) des zu transformierenden Stammes wurde innerhalb von 12 h angezogen. Diese Kultur wurde mit frischem LB-Medium verdünnt (50 ml) und bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,3$ kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und in ein steriles, vorgekühltes Greiner-Röhrchen überführt. Es erfolgte die Sedimentation durch Zentrifugation (10 min, 2000 g, 4°C, *Biofuge Fresco*, Heraeus). Das Pellet wurde in ca. 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 2 ml 0,1 M CaCl_2 -Lösung aufgenommen und bis zur Transformation 1-24 h auf Eis inkubiert. Die Lagerung fand bei -80°C statt, nachdem die kompetente Zellen mit Glyzerin [Endkonzentration 25 % (v/v)] versetzt wurden.

2.2.3 Transformation von Ca^{2+} kompetenten Zellen

Je 100 - 200 μl Ca^{2+} -kompetente Zellen (frisch oder auf Eis aufgetaut) wurden mit der DNA aus der Ligation (2.4.5) oder der Plasmidisolation (2.4.1) gemischt und ca. 30 min auf Eis

inkubiert. Nach dem folgenden Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C (Thermomixer) erfolgte die Abkühlung der Ansätze für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 0,4 ml SOC-Medium und Inkubation für 45 min bei 37°C wurden 150 µl auf Selektionsagar ausplattiert. Die Platten wurden 12 h bei 37°C inkubiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Messung der Zellzahl

Für die Messung der Zellzahl wurden 25 µl der Zellsuspension in 10 ml Casyton – Lösung überführt (Verdünnung 1:400) und mittels CASY Technologie (Innovatis, Reutlingen, Germany) mit einem für die Zelllinie bestimmten Programm gemessen.

2.3.2 Beschichtung von Plastik Kulturschalen

Alle Kulturschalen für ReNcell VM Kultivierung wurden mit Laminin (Trevigen, Gaithersburg, USA) beschichtet. Die Wells oder Flaschen wurden mit einem Lamininstock (1 mg/ml), welcher 1:100 in eiskaltem DMEM/F12 (Invitrogen) verdünnt wurde, beschichtet. Die Laminierung erfolgte für mindestens eine Stunde in einem Zellkulturinkubator (Heraeus, Hanau, Germany) bei 37°C. Danach wurde die Lösung entfernt und die Kulturschalen mit DMEM/F12 gewaschen.

2.3.3 Kultivierung und Differenzierung von ReNcell VM Zellen

Die ReNcell VM Zelllinie ist eine v-Myc retrovirale immortalisierte Zelllinie, welche aus einem fetalen humanen ventralen Mittelhirn separiert wurde (ReNeuron Ltd., Guildford, UK). Die

Zelllinie wird über Milipore (Schwalbach/Ts., Germany) vertrieben. Die Zellen sind fähig, in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren (Donato et al. 2007).

Die Zellen wachsen in Laminin beschichteten Flaschen bei 5 % CO₂ und 37°C in Proliferationsmedium und werden bei ungefähr 80 % Konfluenz passagiert. Dafür wurden die Zellen mit vorgewärmten HBSS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/Benzonase-Lösung innerhalb von 2-3 Minuten bei 37°C von der Oberfläche abgelöst. Diese Reaktion wurde durch Trypsin-Inhibitor-Benzonase Lösung gestoppt. Danach wurden die Zellen bei 100 x g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in Proliferationsmedium (mit Wachstumsfaktoren EGF und bFGF) resuspendiert und die Zellzahl gemessen (2.3.1). Danach wurde eine definierte Zahl von Zellen in eine Laminin-beschichtete Flasche mit Proliferationsmedium überführt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

48 h nach dem Aussäen der Zellen wurden die undifferenzierten monolayer Zellen bei der Konfluenz von etwa 80 % mit HBSS gewaschen und durch Medium ohne Wachstumsfaktoren (EGF und bFGF) differenziert. Die Zellen differenzierten daraufhin bis zu sieben Tagen und bildeten dabei ein Netzwerk aus Neuronen und Gliazellen aus. Für FACS (2.5.6), Western Blot (2.5.5) und Real-Time RT PCR (2.4.10) wurden in 6-Well Platten ca. 350.000 Zellen ausgesät, während bei 8-well Chamber Slides ca. 20.000 Zellen pro Kammer für Immunocytochemie (2.5.7) ausgesät wurden.

2.3.4 Kultivierung und Differenzierung von ST14A Zellen

Die Rattenzelllinie ST14A ist eine immortalisierte Zelllinie, welche die Eigenschaft von Progenitorzellen des Zentralen Nervensystems vorweist (Cattaneo et al. 1998). Sie wurden in unbeschichteten Kulturschalen bei 33°C kultiviert und proliferiert. Die Passagierung erfolgte bei ca. 90 % Konfluenz. Hierzu wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und danach mit einer Trypsin/EDTA - Lösung bei 33°C für 3 bis 5 Minuten abgelöst, wobei auch ein Schaber zur Hilfe genommen werden konnte. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit Proliferationsmedium. Danach wurden die Zellen 1:5 verdünnt und auf neue Flaschen aufgeteilt.

Um ST14A Zellen zu differenzieren, wurden diese in einen Inkubator bei 39°C weiter kultiviert, da diese Zelllinie darauf konditioniert wurde, bei dieser Temperatur zu differenzieren. Die Differenzierung erfolgte maximal 3 Tage lang.

2.3.5 Kultivierung von Embryonen

Befruchtete Eier von „White Leghorn“ Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) lieferte eine lokalen Farm. In einem Inkubator (Grumbach, Asslar, Deutschland) inkubierten die Eier bei 37,5°C und 65 % Luftfeuchtigkeit. Dabei wurden die Eier elektronisch alle 8 h gedreht. Für die Western Blot - Studie wurden die Embryos bei Entwicklungsstadium (E) 10, E12, E14, E16, E18 und E20 gesammelt und mit 400 µl pro 100 mg Gewebe lysiert.

Für die Transfektion wurden die Embryonen am dritten Tag aus ihren Eiern entfernt und in eine 9 cm große Petrischale überführt, welche sich in einer mit Wasser befüllten 15 cm Petrischale befand. Um den Embryo vor dem Austrocknen zu schützen, wurde die größere Petrischale mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen. Die Inkubation erfolgte dann für 24 h bei 37°C.

2.3.6 Transfektion von ReNcell VM Zellen

1 bis 3 Millionen Zellen wurden mit 2 bis 4 µg Vektor DNA transfiziert. Dafür wurde Amaxa Nucleofector (amaxa, Gaithersburg, USA) in Kombination mit Nucleofector Kit V gemäß der Bedienungsanleitung mit dem Programm X-001 genutzt. Die transfizierten Zellen wurden anschließend in ein vorgewärmtes Proliferationsmedium überführt und danach in laminierte Kultivierungsschalen ausgesät.

2.3.7 Transfektion von Embryonen

Für die Transfektion wurden vorbereitete Embryonen (2.3.5) von E4 benutzt und es wurden 0,1 – 0,5 µl einer GBSS Lösung, welche einen Mix aus dem ADAM-Plasmid (2 µg/µl) und dem GFP-Plasmid (0.25 µg/ml) sowie 0,1 % Fast Green (Sigma) bestand, durch eine Glaskapillare in den Embryo injiziert. Für die Elektroporation wurden zu zwei Seiten des Embryos (in Umgebung der Injektionsstelle) Elektroden positioniert und die Plasmide durch elektronische Pulse in die Zellen des Embryos transfiziert. Nach mindestens zwei Tagen wurde der Embryo aus dem Inkubator in eine Petrischale überführt und die GFP Fluoreszenz mittels Keyence Mikroskop sichtbar gemacht. Anschließend wurde der Embryo mit 4 % Formaldehydlösung fixiert und mittels Sucroselösung dehydriert und anschließend in Tissue Tek bei -80°C eingefroren.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation von Vektor DNA

Zum Isolieren von Vektoren aus *E. coli* Kulturen wurde das ZYPPY Plasmid Mini Kit (Zymo-Research) verwendet. 5 ml einer Kultur wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 rpm bei RT pelletiert und danach laut Anleitung bearbeitet. Die Vektoren lagerten danach entweder bei -20°C oder wurden für spätere Anwendungen sequenziert (2.4.12) beziehungsweise für eine Restriktion (2.4.2) verwendet.

Für größere Mengen wurde das Endo-Free Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet und eine 200 ml *E. coli* Kultur nach Anleitung verarbeitet. Die DNA wurde mit TE - Puffer gelöst und eine ca. Konzentration von 1 µg/µl des Vektors eingestellt und danach der Vektor bei -20°C gelagert.

2.4.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionendonukleasen binden spezifisch an definierte Gebiete der doppelsträngigen DNA. Die Restriktion wurde mit Hilfe von Enzymen und den dazugehörigen mitgelieferten Puffern durchgeführt. Hierzu inkubierten zu analytischen Zwecken rund 500 ng DNA mit 5 U des entsprechenden Enzyms, Puffer und Wasser bei 37°C für 2 h. Danach erfolgte eine Auftrennung über eine Gelelektrophorese (2.4.4). Für präparative Zwecke wurden 4 µg DNA mit 10 U des entsprechenden Enzyms, Puffer und Wasser bei 37°C für 6 h inkubiert. Danach wurde der Restriktionansatz bei 70°C für 20 Minuten erhitzt, um das Enzym zu deaktivieren. Für eine Separierung der Fragmente wurden diese über die Gelelektrophorese aufgetrennt und danach aus dem Gel isoliert (2.4.3).

2.4.3 Isolierung von DNA und PCR-Fragmenten

Für die Reinigung von DNA - Fragmenten aus einer Lösung oder von einem Gel diente das GFX purification Kit (GE healthcare, Munich, Germany), welches nach Anleitung benutzt wurde. Die DNA wurde mit 30 µl H₂O eluiert und die Konzentration (2.4.11) gemessen. Die Proben lagerten entweder bei -20°C oder wurden für weitere Analysen, wie Sequenzierung (2.4.12) und Ligation (2.4.5) verwendet.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA Agarose-Gelelektrophorese

Die Herstellung der Gele erfolgte durch das Erhitzen in einer Mikrowelle von 1,5 bis 2 % Agarose (Biozym) in 1xTAE Puffer. Ethidiumbromid (1µg/ml Arbeitskonzentration) wurde hinzugegeben und das Gemisch wurde in eine mit Kamm vorbereitete Gelkammer gegossen. Die DNA wurde mit einem 6x loading dye (MBI Fermentas, St.-Leon-Roth, Germany) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Gele liefen bei 100 V und wurden anschließend

durch das UV-Geldokumentationssystem (Herolab), in Kombination mit einem digitalen Kamerasystem (C-5050; Olympus, Japan) analysiert. Die Größenbestimmung der DNA Fragmente erfolgte mit Hilfe eines mitlaufenden Markers (100 bp Ladder Plus oder DNA Ladder Mix, MBI Fermentas).

RNA Agarose-Gelelektrophorese

Zur Integritätsprüfung von RNA - Proben wurde die RNA mittels eines Formaldehydgels aufgetrennt. Die Gele wurden durch das Mischen von 10 ml eines 10 - fachen Formaldehydgelpuffers und 90 ml RNase freiem Wassers mit 1,2 g Agarose hergestellt. Der Mix wurde in einer Mikrowelle bis zum Schmelzen der Agarose erhitzt und auf 65°C abgekühlt. 1,8 ml einer 37 % (12,3 M) Formaldehydlösung sowie 1 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromidstocklösung wurden hinzu gegeben und nach dem Vermischen in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Das Gel äquilibrierte für 30 min in 1x Formaldehyd - Gellaufpuffer. Die RNA - Proben wurden mit 2x RNA loading dye (MBI Fermentas, St.-Leon-Roth Germany) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Gele liefen bei 100 V und wurden anschließend durch das UV - Geldokumentationssystem (Herolab) in Kombination mit einem digitalen Kamerasystem (C-5050; Olympus, Japan) analysiert. Die Größenbestimmung der DNA - Fragmente erfolgte mit Hilfe eines mitlaufenden Markers (RiboRuler, MBI Fermentas). Scharfe Banden der 28S/18S rRNA mit einer Intensität von 2:1 sind ein Anhaltspunkt für eine intakte RNA.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden 50 ng linearisiertes Vektorkonstrukt (2.4.2) und 150 ng an aufgereinigtem DNA - Fragment (2.4.3) genutzt. Für die Ligation wurden die beiden Fragmente über Nacht bei 4°C mit einer T4 DNA - Ligase (T4 DNA Ligase Kit, Promega), T4 Ligasepuffer und Wasser mit einem Gesamtraktionsvolumen mit 10 µl inkubiert. Nach der Ligation wurde die Hälfte des Gesamtvolumens für eine Transformation von *E. coli* (2.2.3) genutzt.

2.4.6 Polymerase Kettenreaktion

Standard-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion diente einerseits zum Amplifizieren von DNA - Abschnitten, andererseits zum Analysieren von Klonen.

Für präparative und analytische Zwecke wurde die *Taq* - Polymerase (Red Load Taq Master, Jena Bioscience) eingesetzt. Als Template wurden gereinigte DNA aus einer Miniprep bzw. Maxiprep (2.4.1) verwendet.

Reaktionsansatz:	10 µL	5 x <i>Taq Master Mix</i>
	0,2-1 µM	Primer 1
	0,2-1 µM	Primer 2
	2-50 ng	<i>Template</i> -DNA
	add. 50 µL H ₂ O _{bidest}	

Die Reaktionen wurden im *Thermocycler (PCR System 9700, Applied Biosystems)* nach folgendem Programm durchgeführt:

1.	2 min	94°C	<i>Hot-Start</i>
2.	30 s	94°C	Denaturierung
3.	30 s	55 - 65°C	<i>Annealing</i>
4.	1 min	72°C	<i>Extension</i>
Zyklusanzahl (2-4): 30			
5.	1 min	72°C	
6.	Pause	4°C	

Die *PCR*-Produkte wurden mittels analytischer Agarose - Gelelektrophorese untersucht bzw. mittels präparativer Gele weiterverarbeitet.

Kolonie-PCR

Die Kolonie - *PCR* diente der Analyse transformierter Zellen. Es wurde Zellmaterial von Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in ein *PCR*-Reaktionsgefäß überführt und in 100 µL H_2O_{bidest} resuspendiert. Die Zellsuspension inkubierte für 2 min bei 95°C. Danach wurde das Reaktionsgefäß 5 min bei 16.060 g zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus GmbH, Hanau) und der Überstand anschließend in ein neues *PCR* - Reaktionsgefäß überführt. Ein neuer *PCR* - Ansatz wurde so pipettiert, dass das Volumen für DNA - Template und des Wassers aus dem Überstand der Zellsuspension stammen. Die Analyse der *PCR* - Produkte erfolgte mittels analytischer Agarose - Gelelektrophorese.

2.4.7 Aufreinigung von Gesamt-RNA

Die Gesamt - RNA wurde mit Hilfe von RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) extrahiert. Nach der Ablösung der Zellen (2.3.4) wurden die Zellen gezählt (2.3.1) und mit HBSS gewaschen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 300 x g und RT lagerten die Pellets in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert und danach bei -20°C.

2.4.8 Microarray

Für die Microarrays wurde die RNA (2.4.7) mittels Chiptechnik von Herrn Dr. Koczan aus dem Institut für Immunologie mit „Human gene 1.0 ST“ Chips von Affymetrix analysiert. Die Auswertung erfolgte über die Affymetrixsoftware sowie über Exel (Office 2003).

2.4.9 cDNA Synthese

Die cDNA wurde mit dem FastLane cDNA Kit (Qiagen) generiert. Die Zellen wurden in 6 - Well Platten kultiviert und nach dem Ablösen mit PBS gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Pellets in 100 µl FCP - Puffer suspendiert, welcher zur Zelllyse und zur RNA - Stabilisierung dienen sollte. 4 µl des Lysates wurden für die cDNA Synthese verwendet. Danach wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.4.10 Quantitative Real-Time RT PCR

Für die Quantifizierung des mRNA Gehalts diente der LightCycler 1.5 (Roche) mit der LightCycler 3.52 Software, wobei im Vorfeld die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. Für die Detektion wurde ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR - Green), welcher an doppel-strängige cDNA bindet, verwendet, da das so generierte Signal proportional zur DNA Konzentration ist. In früheren Zyklen steigt das DNA Level exponentiell an. Die Akkumulation des Produktes sowie der Verbrauch an Primern und Nukleotiden führen zu einem Stopp dieses Prozesses. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung der cDNA Level die Amplifikationszyklen genutzt, bei welchem die Software die erste cDNA detektieren konnte. Gemessen wurden die C_t -Werte, welche den Zyklus darstellen, bei dem sich das Signal aus dem Hintergrund (Threshold) abhebt. Die Amplifikationseffizienz von jedem Primerpaar wird durch eine Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe (human total brain cDNA, Clontech) bestimmt. Die Effizienz wird durch das grafische Auftragen des C_t -Wertes gegen die logarithmierten cDNA Mengen berechnet. Die PCR wurde mittels FastStart DNA SYBRGreen Plus Kit (Roche) nach Anleitung durchgeführt. Ein Template von 20 µl cDNA wurde mittels FastLane Cell cDNA Kit (Qiagen) hergestellt (2.4.9) und davon 1 bis 4 µl für die nachfolgende Reaktion verwendet. Als Reaktionsgefäße dienten LightCycler Kapillaren (Roche) für das Volumen von 20 µl pro Probe. Alle Proben liefen in technischen Duplikaten. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Template und als Positivkontrolle diente human total brain cDNA (Clontech). Die Zyklenparameter waren wie folgt:

- | | | | |
|----|--------|------|------------------------|
| 1. | 12 min | 95°C | initiale Denaturierung |
| 2. | 5 sek | 95°C | Denaturierung |
| 3. | 5 sek | 62°C | Annealing |
| 4. | 10 sek | 72°C | Elongation |

Zyklenanzahl (2 bis 4): 45

Danach folgte die Schmelzkurvenanalyse. Alle Primer amplifizierten unter den gegebenen Parametern keine genomische DNA. Nach der PCR wurden die Produkte via Agarosegel (2.4.4) und Schmelzkurve überprüft. Die relativen Unterschiede der mRNA Mengen wurden durch die delta-delta C_t Methode (Pfaffl 2001) berechnet. Zur Normalisierung der mRNA Mengen diente das Housekeeping-Gen Glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD), wodurch die relativen Unterschiede zur Kontrolle dargestellt werden konnten.

2.4.11 Photometrische DNA/RNA Konzentrationsmessung

Die DNA - Konzentration und DNA - Reinheit wurden durch die Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm durch ein Spektrophotometer (Ultrospec 3100pro, Amersham, München, Germany) bestimmt. Bei 260/280 nm weist einen Ratio von 1,8 bis 2 auf eine hohe DNA - Qualität hin.

Die Bestimmung der Quantität und Qualität von Gesamt-RNA erfolgte durch ein Spektrophotometer (Ultrospec 3100pro, Amersham, Munich, Germany). Auch hier weist bei 260/280 nm einen Ratio von 1,8 bis 2 auf eine hohe DNA - Qualität hin.

2.4.12 DNA Sequenzierung

Für die Identifizierung von aufgereinigter DNA (2.4.1; 2.4.3) wurden die Proben zum Sequenzieren zur Firma AGOWA (Berlin, Germany) verschickt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte über BioEdit oder Multalin Software.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Lyse von Zellen und Gewebe

Für Zelllysate wurden adhärenente Zellen zuerst mit HBSS und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zelllyse erfolgte mit eiskaltem RIPA - Puffer, welcher einen Protease-Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Roche) enthielt. Nach 10 minütiger Lyse auf Eis wurde die Suspension bei 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde für die Proteinkonzentrationsbestimmung (2.5.2) verwendet. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Für Gewebelysate wurde das entsprechende Gehirngewebe vom Embryo entfernt und mit 400 µl Ripa-Puffer pro 100 mg Gewebe zerkleinert und sonifiziert. Danach erfolgte die Lyse für 10 min auf Eis.

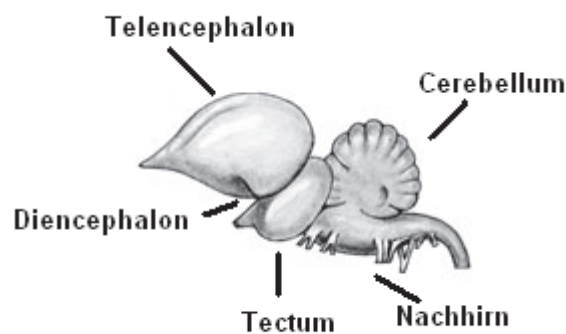


Abb. 2: Gehirn Hühnerembryo (<http://www.fotosearch.de/lifeart/tieranatomie/LIF146/>)
Abbildung der fünf verschiedenen Gehirnregionen im Hühnerembryo

2.5.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bicinchoninsäureassay (BCA, Pierce, Rockford, IL, USA) unter Benutzung der Anleitung und mit Hilfe eines Plattenlesers (Tecan) bestimmt.

2.5.3 SDS- Acrylamid- Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde ein vertikales Tris-HCl - Gel mit 4 bis 15 % Acrylamidkonzentrationsgradient (Criterion Precast, Bio-Rad) in Kombination mit einer Criterion Cell Gelkammer (Bio-Rad) genutzt. Die Separation der Proben erfolgte bei 200 V, bis die Lauffront der Proben den Boden des Gels erreicht hatte. Der prestained peqGOLD Marker IV (PEQLAB, Erlangen, Germany) wurde als molekularer Gewichtsmarker benutzt. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 5 - fach konzentriertem Probenpuffer versetzt.

2.5.4 Coomassie-Färbung von Proteinen (Weber und Osborn, 1969)

SDS-Gele wurden über Nacht in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit Wasser.

2.5.5 Western Blot

Um die Proteine mit Antikörpern zu detektieren, mussten die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe eines Semi-Dry Blot Systems (Trans-BlotSD, Bio-Rad) transferiert werden. Vor dem Blotten wurden Whatman - Papier, Nitrozellulosemembran und SDS – Gel 5 min in SDS Transferpuffer geschwenkt. Auf die Anode wurde die Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL, Amersham) auf ein Whatman - Papier gebettet. Das Gel wurde auf der Membran platziert und wiederum mit einem Whatman - Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte 1,5 h bei konstanten 100 mA pro Membran. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit 3 % Milchpulver (Fluka) in TBST geblockt, gefolgt von der Erstantikörperinkubation über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C. Der Blot wurde dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend mit einem geeigneten fluoreszierenden Zweitantikörper für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschschritten in TBST trocknete der Blot im Dunkeln an der

Luft. Visualisierung und Quantifizierung erfolgte mit dem Odyssey Infrarot Imaging System (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany). Die Membranen wurden bei einer Wellenlänge von 700 nm für Alexa Fluor 680-gekoppelte Antikörper und 800 nm für IRDye 800CW-gekoppelte Antikörper mittels der Odyssey Software Version 1.2. gescannt. Die Expression von GAPDH wurde zur Normalisierung genutzt und somit die Expressionslevel der verschiedenen Proteine ermittelt.

2.5.6 FACS Analyse

In der FACS (Fluoreszenz-Aktivierter Zellsortierer) Analyse wurden Zellen in einem kontinuierlichen Suspensionsfluss durch einen Laser analysiert. Jede Zelle reagiert auf das Laserlicht und gibt ein Fluoreszenzlicht ab, welches detektiert werden kann.

Gemessen wurden folgende typische Parameter:

- Vorwärtsscatter (FSC): Intensität ist proportional zum Zelldurchmesser
- Seitwärtsscatter (SSC): Intensität ist proportional zu der Quantität der Strukturen in der Zelle
- Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Wellenlängen

Für die Detektion von Proteinen in einer Zellpopulation wurden Zellen von zwei Wells einer 6-well Platte mit HBBS gewaschen, abgelöst und die Zellen mit 100 x g für 5 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen mit 400 µl 1 % PFA für 15 min bei RT fixiert und nach einer weiteren Zentrifugation bei 100 x g für 5 min wurde das Pellet in 500 µl Waschpuffer resuspendiert. Danach konnte die Suspension entweder bei 4°C gelagert oder die Zellen für die FACS - Färbung erneut pelletiert werden. Anschließend erfolgte die Resuspension mit 25 µl Antikörper-Saponinpuffer - Lösung sowie die Inkubation für 2 h auf einem Schüttler bei RT. Als Negativkontrolle inkubierten die Zellen entweder ohne Erstantikörper oder mit Normal - Maus/Kaninchen - Serum. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 300 µl Sapo-

ninpuffer gewaschen und dann mit 25 µl Zweitantikörperlösung für 1 h dunkel auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach wiederholtem zweimaligen Waschen mit je 300 µl Saponin-puffer wurden die Zellen in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und bis zur Analyse (max. 24 h später) bei 4°C gelagert.

Für jede Bedingung wurden 10.000 Zellen gezählt und durch das FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) in Kombination mit der CellQuest Pro Software vermessen. Zelltrümmer und aggregierte Zellen, welche durch den Vorwärtsscanner gemessen wurden, sind dabei aus der Analyse ausgeschlossen. Zellen von negativen Proben wurden dabei durch Gate von der Analyse ausgeschlossen. Dieses Gate wurde auf alle Proben übertragen, um somit die positiven Zellen analysieren zu können.

2.5.7 Immunozytochemie und Immunohistochemie

Immunozytochemie

Zellen auf Objektträgern (Chamber Slides) wurden mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Objektträger entweder weiter behandelt oder bei 4°C mit 0,02 % NaN_3 in PBS gelagert. Für das Färben mit Antikörpern wurden die Zellen für 30 min mit dem IC Blockpuffer bei RT inkubiert. Der Erstantikörper (im IC-Antikörperinkubationspuffer) wurde je nach Antikörper entweder eine halbe Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor dem Behandeln mit dem Zweitantikörper für 30 Minuten wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Ab der Behandlung mit dem Zweitantikörper wurden die Objektträger dunkel gestellt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Mountingmedium (VectaShield), welches DAPI für die Zellkernfärbung enthielt, beschichtet und mit einem Deckglas abdeckt. Zellen ohne Erstantikörper dienten als Kontrolle für die Hintergrundfärbung. Die Fluoreszenzbilder wurden mittels Biozero Mikroskop (Keyence) erzeugt.

Immunohistochemie

Die bei -80°C gelagerten Objektträger tauten 40 bis 60 Minuten bei 50°C auf. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger in einer Küvette mit 0,2 M Trispuffer pH 9,0 für 10 min in einem 85°C warmen Wasserbad inkubiert und danach innerhalb von einer Stunde langsam wieder abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte fixiert indem die Objektträger für 30 min bei 4°C in einer Küvette mit 4 % PFA fixiert wurden .

Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen für je 5 Minuten in TBS. Anschließend inkubierte das Gewebe auf den Objektträgern für 1h bei RT mit IH-Blockpuffer, gefolgt von der Erstkörperinkubation bei 4°C über Nacht. Für die zweite Erstantikörperinkubation wurde der Antikörper nach dreimaligem Waschen mit TBS für 2h bei RT auf die Schnitte gegeben.

Nach 3 Waschschritten mit TBS wurde der Zweitantikörper AlexaFluor 488 (Maus/ Kaninchen) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend nach wiederholtem Waschen folgte für 5 Minuten die DAPI-Färbung (200 ng/ml), gefolgt von 3 Waschschritten und dem Eindecken der Gewebeschnitte mit Mowiol und Deckglas. Bis zur Visualisierung mit Biozero Mikroskop (Keyence) wurden die Objektträger dunkel bei 4°C gelagert.

2.5.8 Axonmessung

Nach einer Beta-III-Tubulin - Färbung der Objektträger folgte die Auswertung mittels Biozero Mikroskop (Keyence). Hierzu wurden zufällig positive Zellen ausgewählt und mit Hilfe der Keyence - Software die Faserlänge der einzelnen Zellen bestimmt, indem man den Fasern von Anfang bis Ende durch die Markierung folgte. Je nach Vergrößerung wurde dann die entsprechende Länge der jeweiligen Ausläufer automatisch durch die Keyence-Software kalkuliert. Je Bedingung und Experiment wurden 80 bis 100 Zellen vermessen.

Bei einer weiteren Methode der Ausläuferlängenmessung erfolgte die Bestimmung der Ausläuferlänge über eine zweidimensionale Ausläuferlängendichte (Grundersen 1977). Dies wurde mit der Software des Stereoinvestigator realisiert (Evans et al. 2004; Schmitt et al. 1999). Dabei wurden über verschiedene Teilabschnitte randomisiert Zykloide gelegt und die

Schnittpunkte der Ausläufer mit den Zykloiden markiert. Des Weiteren wurden die positiven Zellen im Teilabschnitt gezählt. Die Anzahl der Zykloidenschnittpunkte und der positiven Zelle wurden dann auch den Gesamtabschnitt extrapoliert und die Ausläufer berechnet. Die Berechnung der Ausläufer erfolgte über das Institut für Anatomie mittels folgender Gleichung:

$$L = [2(a/l) * \sum Q(A) * M^{-1}] / (a(\text{frame}) \times \sum P(\text{ref}))$$

a/l : ist der Quotient von Test Area zu Zykloid Länge
 $\sum Q(A)$: ist die Anzahl der Schnittpunkte der Fasern mit den Zykloiden
 M : Vergrößerung bei der die Schnittpunkte gezählt wurden
 $(a(\text{frame}) \times \sum P(\text{ref}))$: gibt die tatsächliche ausgewertete Fläche an.

2.5.9 Apoptosemessung

Die Messung apoptotischer Zellen erfolgte durch das *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red von Roche (Mannheim, Germany). Hierzu wurden ReNcell VM Zellen in Chamber Sildes nach der Transfektion ausgesät und kultiviert. Nach 2 Tagen Proliferation differenzierten die Zellen durch den Entzug der Wachstumsfaktoren. Nach weiteren 0 bis 3 Tagen wurden Proben mit 1 % PFA für 15 min bei RT fixiert und anschließend mit 0,2% HSA in HBS – Puffer bis zur Färbung bei 4 °C gelagert. Die Färbung erfolgte anschließend nach Anleitung. Danach wurde der Objektträger mit Mountingmedium (VectaShield), welches DAPI für die Zellkernfärbung enthielt, beschichtet und mit einem Deckglas abdeckt. Anschließend wurde die Anzahl der positiv apoptotischen Zellen (rot) ins Verhältnis zu den DAPI- positiven Zellen (blau) gesetzt und der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen berechnet.

2.5.10 Statistik

Statistische Berechnungen erfolgten durch einen zweiseitigen studentischen t - Test, welcher durch die Excel-Software (Microsoft, USA) durchgeführt wurde. Eine statistische Signifikanz lag vor, wenn der p - Wert kleiner als 0,05 war.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des *in vitro* Systems

Als *in vitro* Untersuchungssystem dienten ReNcell VM Zellen, welche sich innerhalb von wenigen Stunden differenzieren lassen. Dabei wird unter anderem auch der neuronale Marker Beta-III-Tubulin von den Zellen exprimiert. Mit Hilfe dieses Markers wurde überprüft, ob sich die zu untersuchenden Zellen in Neurone differenzierten (Hübner et al. 2010).

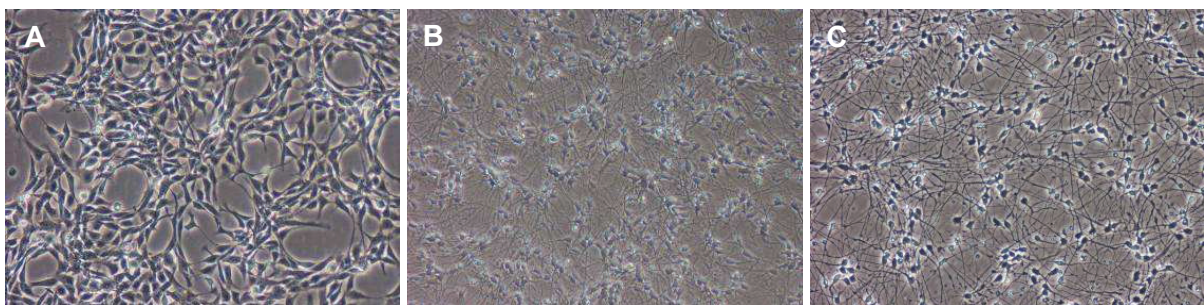


Abb. 3: ReNcell VM Zellen nach unterschiedlichen Stadien der Differenzierung

ReNcell VM Zellen wurden nach zwei Tagen Proliferation (A) differenziert. Nach drei Tagen (B) und sieben Tagen (C) Differenzierung wurden die Zellen fixiert bzw. lysiert. Die Bilder wurden bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Um den Effekt von verschiedenen ADAM – Proteinen auf die neuronale Differenzierung der Zelllinie untersuchen zu können, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Vektoren zur Stimulation oder Repression von ADAM10, ADAM17, ADAM22 und ADAM23 transfiziert und die Proben nach verschiedenen Tagen der Differenzierung gesammelt (Abb. 3). Diese vier verschiedenen ADAM-Proteine wurden verwendet, da diese in der Literatur im Zusammenhang mit der neuronalen Differenzierung genannt werden (Lin et al. 2010, Yan et al. 2010).

3.1.1 Analyse von ADAM10

Die Überexpression von ADAM10 zeigte keine großen Veränderungen. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde eine Co - Transfektion mit pCAGGS-GFP durchgeführt. Nach der mikroskopischen Analyse, wo keine Unterschiede hinsichtlich des Phänotyps festgestellt werden konnten (Abb. 4), wurde eine FACS – Färbung (Abb. 5A) mit Beta-III-Tubulin durch-

geführt, um herauszufinden, ob die neuronale Differenzierung der Zellen beeinflusst wurde. Diese Analyse wies jedoch keine signifikanten Unterschiede auf.

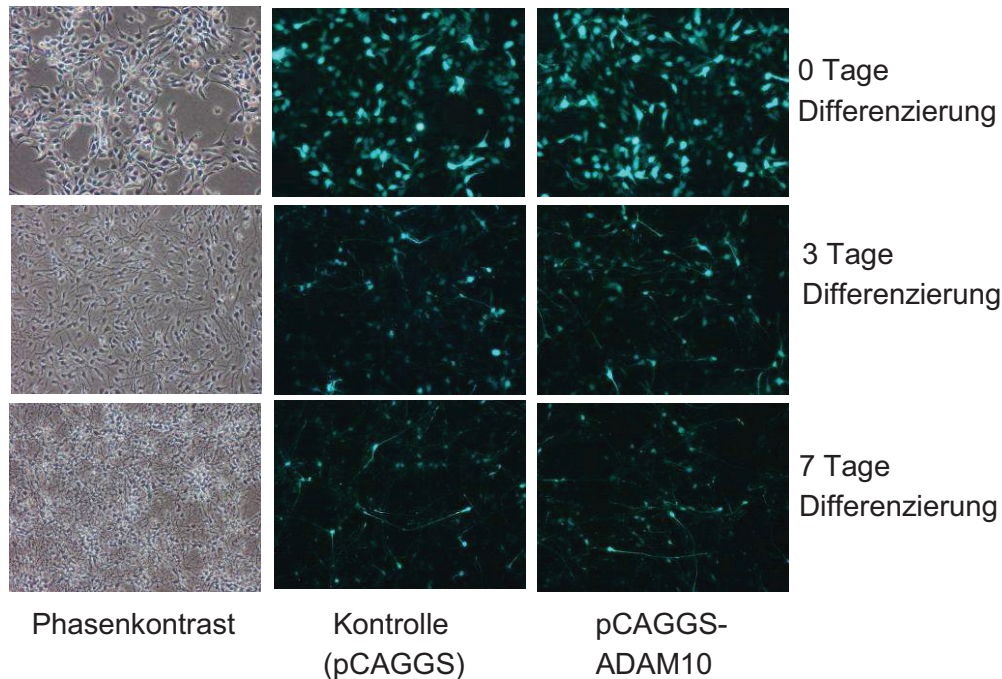


Abb. 4 : ReNcell VM Zellen nach ADAM10 Transfektion bei unterschiedlichen Tagen der Differenzierung
Die mikroskopische Aufnahme nach verschiedenen Tagen der Differenzierung zeigte keinerlei Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Zellen mit nach einer Induktion bzw. Repression von von ADAM10. Die Bilder wurden bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

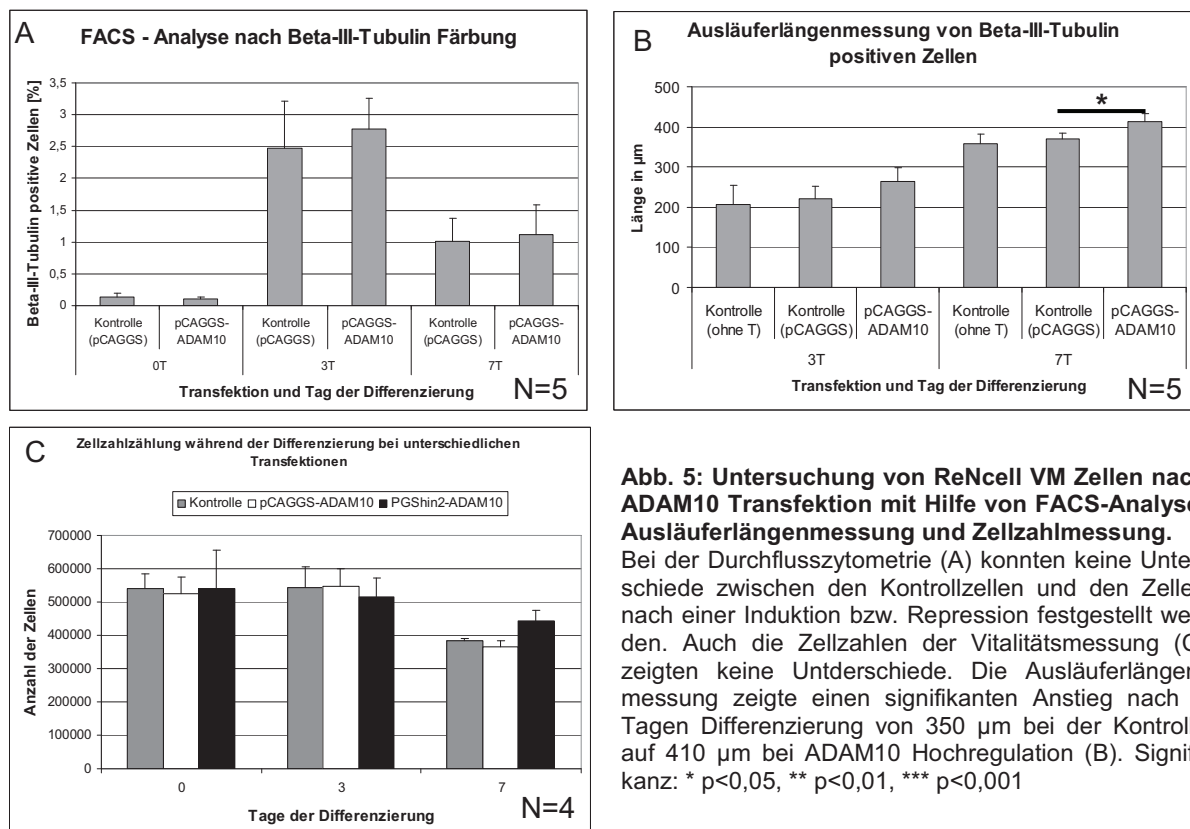


Abb. 5: Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM10 Transfektion mit Hilfe von FACS-Analyse, Ausläuferlängenmessung und Zellzahlmessung.

Bei der Durchflusszytometrie (A) konnten keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den Zellen nach einer Induktion bzw. Repression festgestellt werden. Auch die Zellzahlen der Vitalitätsmessung (C) zeigten keine Unterschiede. Die Ausläuferlängenmessung zeigte einen signifikanten Anstieg nach 7 Tagen Differenzierung von 350 μm bei der Kontrolle auf 410 μm bei ADAM10 Hochregulation (B). Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Auch eine Kontrolle der Ausläuferlängenmessung (Abb. 5B) zeigte nach sieben Tagen der Differenzierung nur geringe Unterschiede, welche aber signifikant waren. Bei einer Herunterregulation von ADAM10 konnten ebenfalls keinerlei Effekte in den verwendeten Analysen erkannt werden. Auch die Analyse der vitalen Zellen zeigte nach verschiedenen Tagen der Differenzierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den ADAM10 transfizierten Zellen und der Kontrolle (Abb. 5C).

Reiss *et al.* beschrieb 2005, dass ADAM10 in der Lage ist N-Cadherin zu spalten und somit die Zell-Zell-Adhäsion und den Beta-Catenin Signalweg beeinflusst. Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von ADAM10 einen Einfluss auf die Beta-Catenin Akkumulation im Zellkern besitzt, wurde eine Fraktionierung der Zellen vorgenommen. Zur Überprüfung wurden frühe Zeitpunkte der Differenzierung (null Tage und drei Tage) gewählt, da beschrieben ist, dass die Anreicherung von Beta-Catenin im Zellkern besonders in den ersten Tagen der Differenzierung gut detektierbar ist (Schmöle *et al.* 2010).

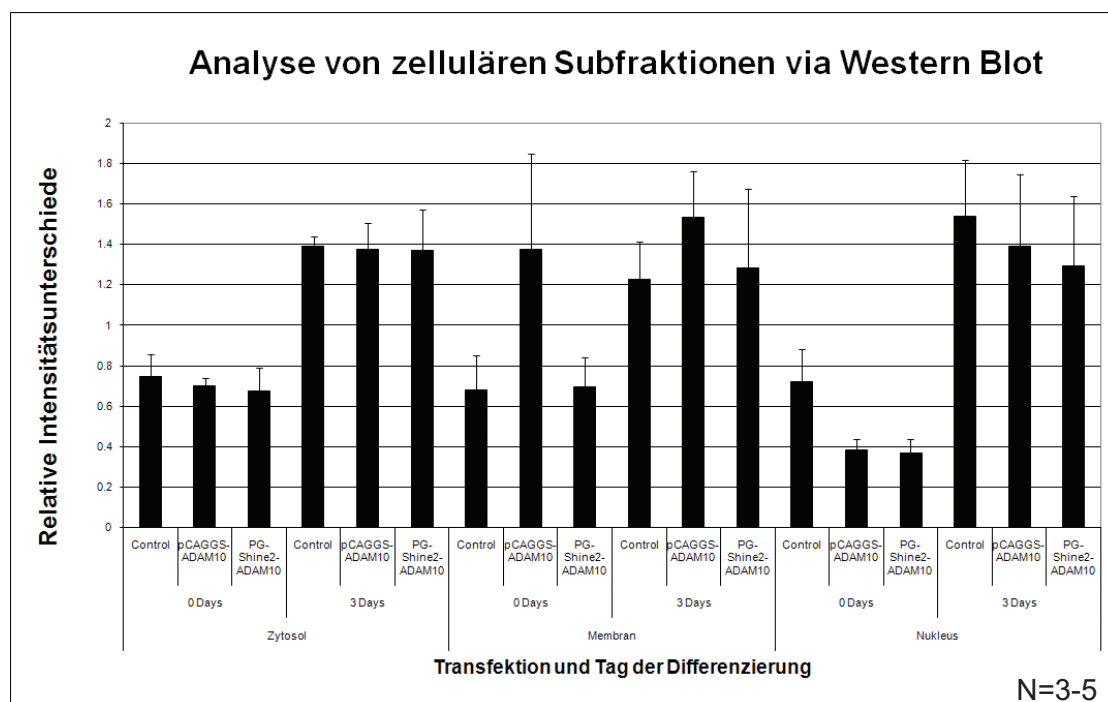


Abb. 6: Untersuchung von zellulären Subfraktionen der ReNcell VM Zellen nach ADAM10 Transfektion mit Hilfe von einer Western Blot Analyse

Bei den Zeitpunkten null und drei Tagen konnten keine Unterschiede zwischen Kontrolle und den Zellen mit Hoch- bzw Herunterregulation von ADAM10 in den verschiedenen den Zellbereichen detektiert werden.

Die Analyse der zellulären Subfraktionen erfolgte mittels Western Blot (Abb. 6). Auch hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den transfizierten

Zellen festgestellt werden. Die in der Literatur beschriebene Anreicherung (Gordon et al. 2006) an β -Catenin während der Differenzierung im Nukleus war hingegen bei allen Proben sichtbar.

3.1.2 Analyse von ADAM17

Eine Hochregulation von ADAM17 zeigte bei einer mikroskopischen Untersuchung (Abb. 7) keine Veränderung zu den Kontrollzellen, wohingegen eine Herunterregulation von ADAM17 zu einer veränderten Ausläuferbildung führte (Abb. 7). Durch Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression und Repression von ADAM17 in dem ReNcell VM Zellen erfolgreich waren (Abb. 8), sodass bei einer Überexpression ein stärkeres Western Blot - Signal und bei Herunterregulation ein schwächeres bis kaum detektierbares Western Blot - Signal vorhanden war. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass mit der eintretenden Differenzierung der untransfizierten Zellen durch, Entzug der Wachstumsfaktoren, eine Abregulation der ADAM17 Expression stattfand (Abb. 8).

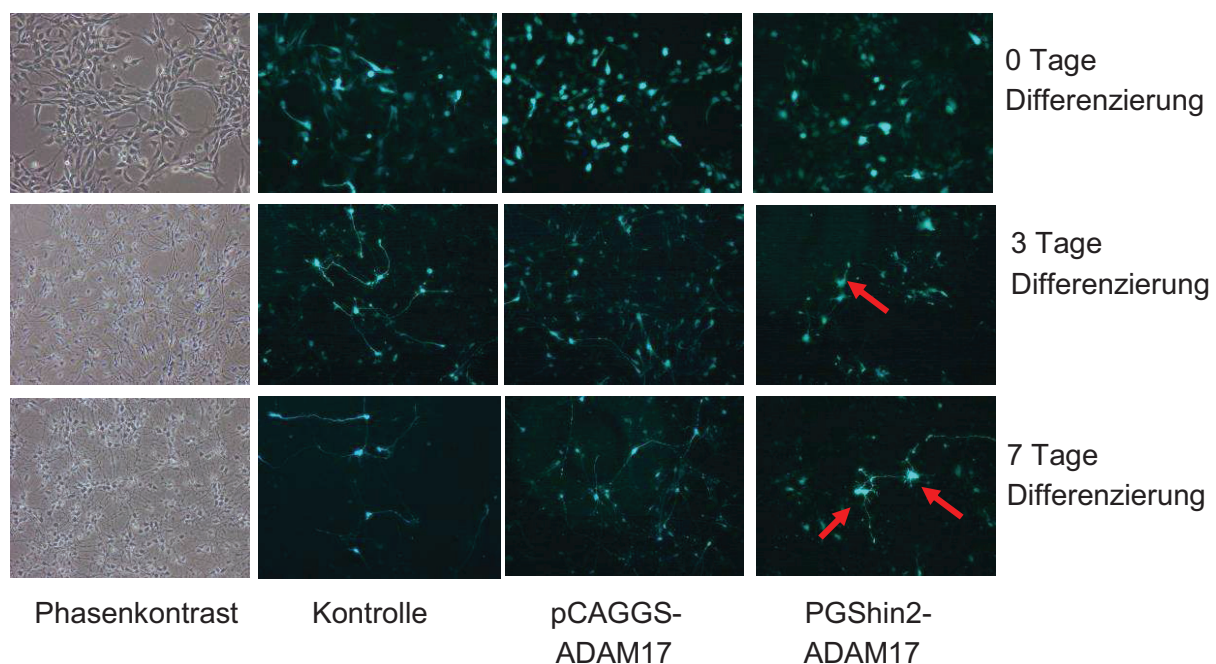


Abb. 7: Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM17 Transfektion

In den mikroskopischen Untersuchungen zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontrolle und Überexpression von ADAM17. Bei der Repression von ADAM17 zeigte sich hingegen im Vergleich zur Kontrolle ein veränderter Phänotyp, welcher auch verkürzte Ausläufer aufwies. Die Bilder wurden bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Eine daraufhin durchgeführte FACS – Analyse (Abb. 9A) wies keine Veränderungen der Beta-III-Tubulin positiven Zellen bei der Hochregulation auf. Dafür konnte aber eine signifikante Erniedrigung der Beta-III-Tubulin positiven Zellen bei der ADAM17 – Herunterregulation ermittelt werden (Abb. 9B).

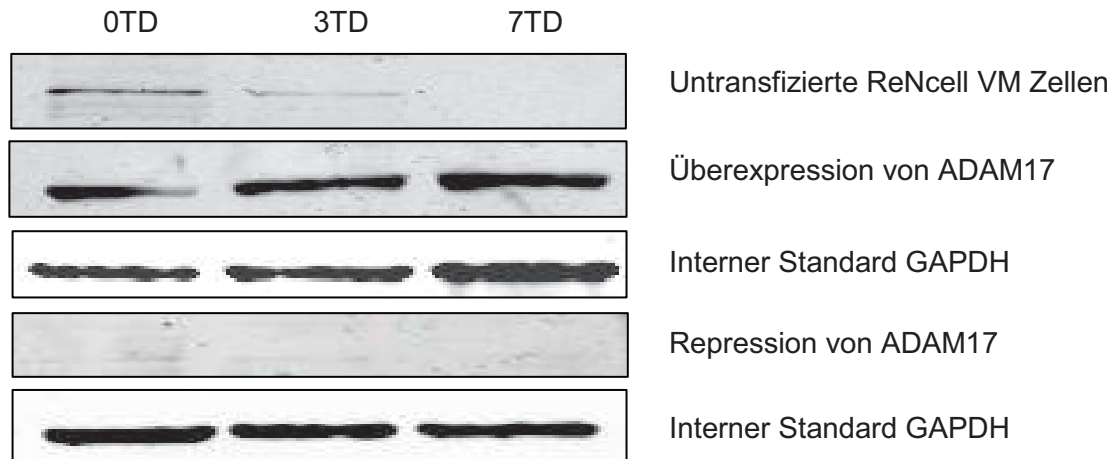


Abb. 8: Untersuchung von ReNcell VM Zellen via Western Blot mit polyklonalen ADAM17 Antikörper
Bei einer Kontrolle der Transfektion via Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Überexpression als auch die Repression von ADM17 in ReNcell VM Zellen realisiert werden konnte. Darüber hinaus zeigten unbehandelte Zellen eine Abnahme von ADAM17 während der Differenzierung.

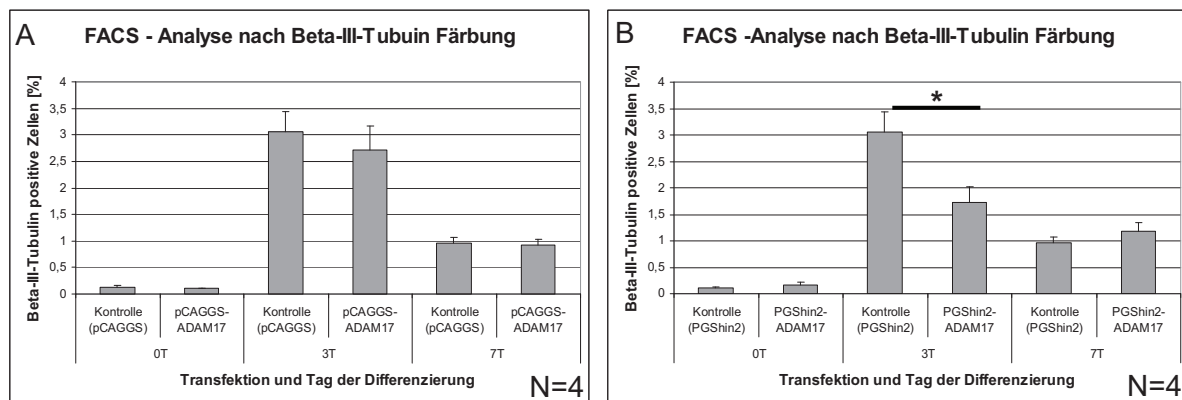


Abb. 9: FACS-Analyse von ReNcell VM Zellen nach ADAM17 Transfektion

Eine Beta-III-Tubulin Färbung bei verschiedenen Tagen der Differenzierung nach unterschiedlicher Transfektion zeigte, dass eine Hochregulation zu keiner signifikanten Veränderung bei den ReNcell VM Zellen führt. Im Gegensatz dazu konnte ein signifikanter Abfall an positiven Zellen bei einer Herunterregulation von ADAM17 nach 3 Tagen Differenzierung detektiert werden. Signifikanz: * $p < 0,05$.

Eine Messung der Ausläuferlängen zeigte, dass sich bei einer Hochregulation von ADAM17 signifikant verkürzte Ausläufer auftraten (Abb. 10A). Eine Herunterregulation von ADAM17 wies auch eine Ausläuferverkürzung auf (Abb. 10B), wobei aber der Wert nach sieben Tagen Differenzierung bei einer Repression deutlich geringer war als bei der Hochregulation (Abb. 10).

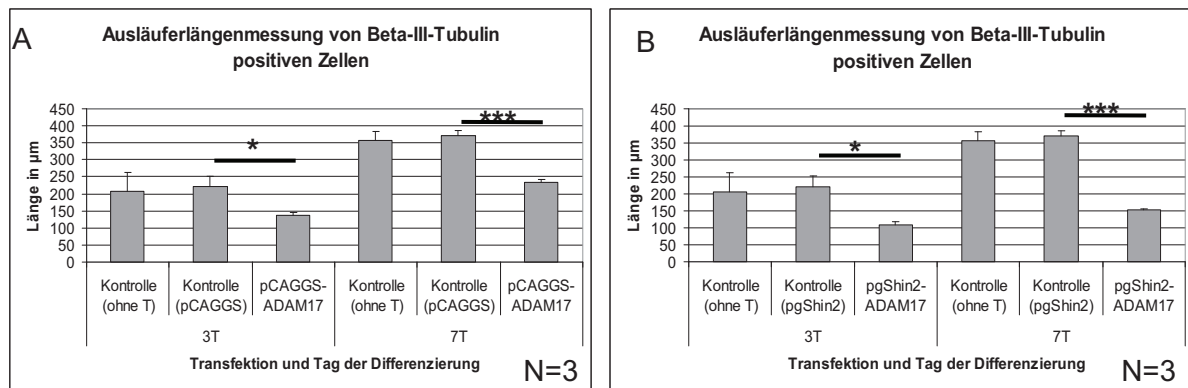


Abb. 10: Faserlängenmessung von ReNcell VM Zellen nach ADAM17 Transfektion mit Hilfe der Keyence Software bei Hochregulation (A) und Abregulation (B) von ADAM17

Die Ausläuferlängen zeigten bei Hoch- und Herunterregulation jeweils eine signifikante Erniedrigung der Werte nach drei und sieben Tagen Differenzierung. Dabei ist von Tag drei zu Tag sieben jeweils ein Anstieg zu vermerken, welcher jedoch bei der Repression von ADAM17 (B) geringer ausfällt. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Um ein vermehrtes Absterben der Zellen auszuschließen, wurde auch hierbei eine Zellzahlmessung mittels Casy vorgenommen, wobei keine signifikanten Änderungen von Hochregulation und Herunterregulation von ADAM17 zur Kontrolle auftraten (Abb. 11).

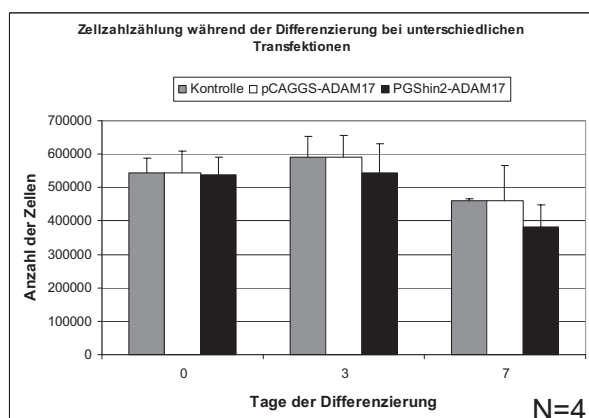


Abb. 11: Messung vitaler Zellen nach 0, 3 und 7 Tagen der Differenzierung und verschiedenen Transfektionen mit ADAM17

Die Zellzahlmessung ergab keine Änderungen in der Anzahl der vitalen Zellen sowohl bei Hoch- als auch bei Herunterregulation von ADAM17.

3.1.3 Analyse von ADAM22

In der mikroskopischen Analyse von ADAM22 transfizierten ReNcell VM Zellen (Abb. 12) konnten im Phänotyp zwischen den Transfektionen kaum Unterschiede ermittelt werden, wohingegen nach einer Beta-III-Tubulin - Färbung im FACS (Abb. 13A) ein leichter Anstieg

an Beta-III-Tubulin positiven Zellen bei transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach drei Tagen Differenzierung ermittelt werden konnte.

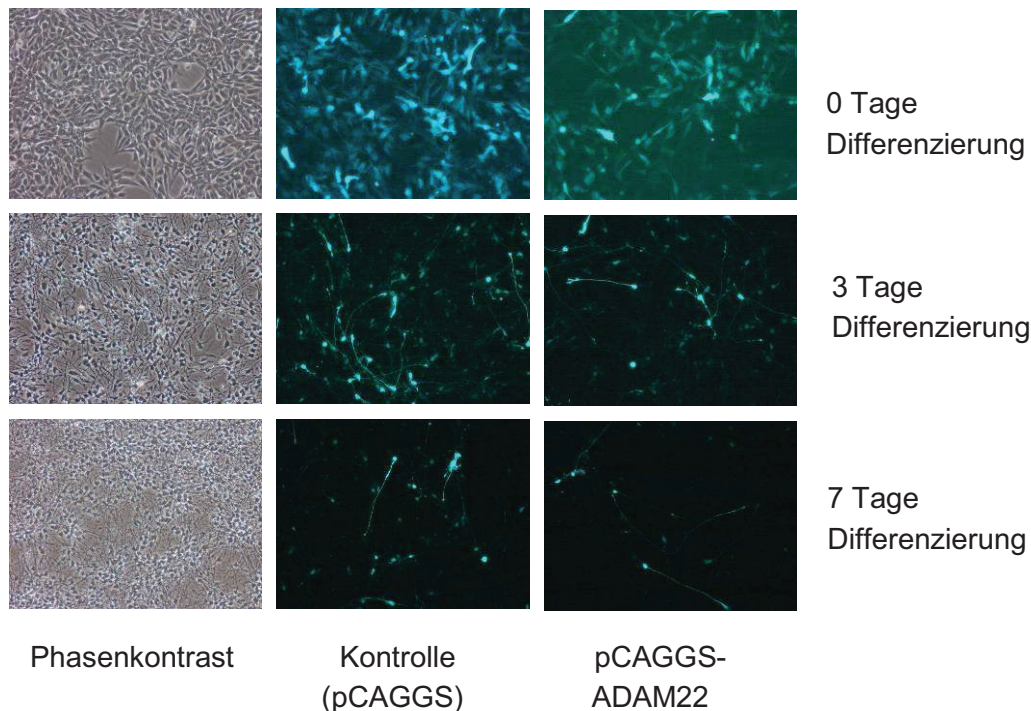


Abb. 12: Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM22 Transfektion

Bei einer mikroskopischen Untersuchung der Zellen konnten keine Unterschiede zwischen den Transfektionen mit ADAM22-Vektor und den Kontrollvektor detektiert werden. Die Bilder wurden bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Bei einer anschließenden Ausläuferlängenmessung (Abb. 13B) konnte ein signifikanter Unterschied nach drei Tagen Differenzierung gemessen werden.

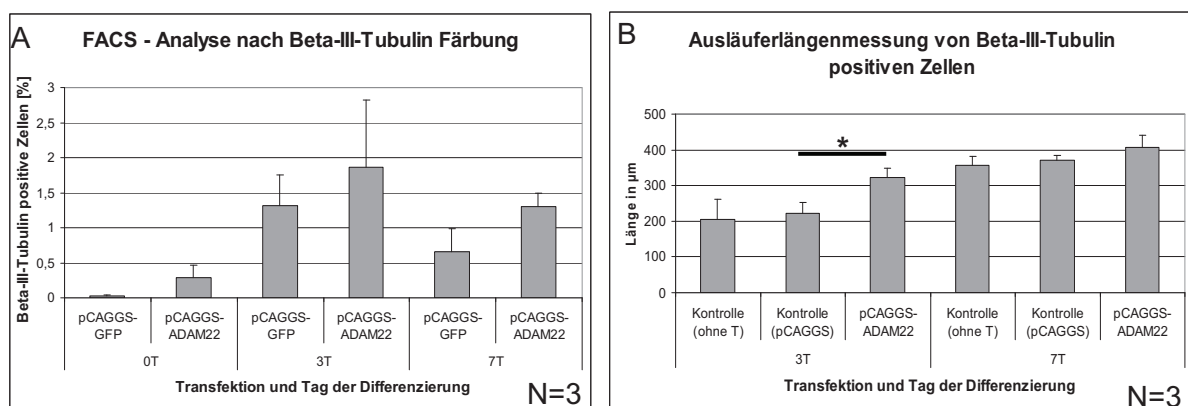


Abb. 13: FACS Analyse von ReNcell VM Zellen nach ADAM22 Transfektion und Ausläufermessung via Keyence Software

Eine FACS-Analyse zeigte nach ADAM22-Transfektion keine signifikanten Unterschiede an Beta-III-Tubulin positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Eine anschließende Ausläuferlängenmessung zeigte, dass ein signifikanter Anstieg nach ADAM22-Transfektion bei drei Tagen vorliegt. Signifikanz: * $p < 0,05$

Des Weiteren wurde eine Zellzahlzählung durchgeführt. Diese zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen ADAM22-Transfektion und Kontrolle (Abb. 14).

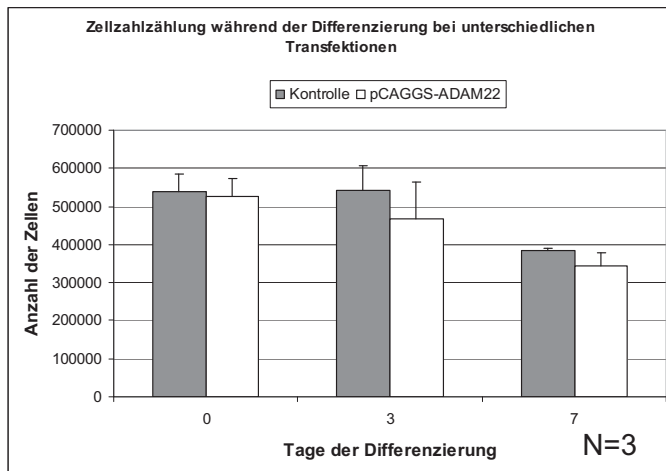


Abb. 14: Messung vitaler Zellen nach 0, 3 und 7 Tagen der Differenzierung und verschiedenen Transfektionen mit ADAM22

Die Zellzahlmessung ergab keine Änderungen in der Anzahl der vitalen Zellen bei einer Hochregulation von ADAM22 im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche mit Leervektor transfiziert worden.

3.1.4 Analyse von ADAM23

Die mikroskopische Untersuchung nach ADAM23 Transfektion wies große Unterschiede zur Kontrolle auf (Abb. 15).

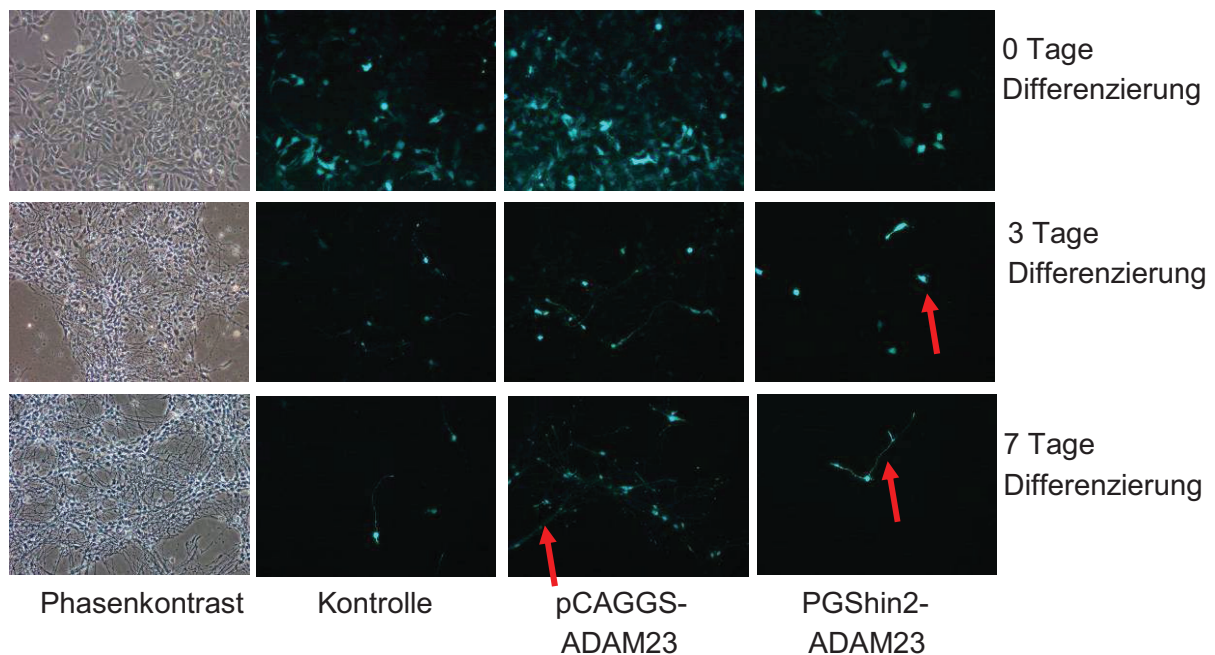


Abb. 15: Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM23 Transfektion mit Hilfe von Western Blot Analyse

Bei der mikroskopischen Untersuchung, nach Transfektion mit ADAM23 Vektoren, wurde ersichtlich, dass die Ausläuferlängen verändert waren. So zeigten sich bei Hochregulation verlängerte Ausläufer, wohingegen bei einer Herunterregulation verkürzte Ausläufer auftraten. Die Bilder wurden bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

So konnten bei einer Stimulation von ADAM23 verlängerte und bei einem Silencing von ADAM23 verkürzte Ausläufer erkannt werden. Die erfolgreiche Transfektion des Hochregulationsvektors sowie des Herunterregulationsvektors konnte mittels Western Blots nachgewiesen werden (Abb. 16). Die anschließende FACS – Analyse zeigte, dass bei ADAM23 Überexpression die Anzahl der Beta-III-Tubulin positiven Zellen signifikant bei drei Tagen angestiegen war (Abb. 17A). Eine Erhöhung konnte auch bei sieben Tagen gemessen werden. Bei einer Herunterregulation von ADAM23 konnten reduzierte Werte von Beta-III-Tubulin positiven Zellen ermittelt werden, welche jedoch nicht signifikant sind (17B). Bei einer zusätzlichen Real - Time - RT PCR zeigte sich eine Erhöhung der Beta-III-Tubulin RNA nach drei Tagen in den Zellen (Abb.18A).

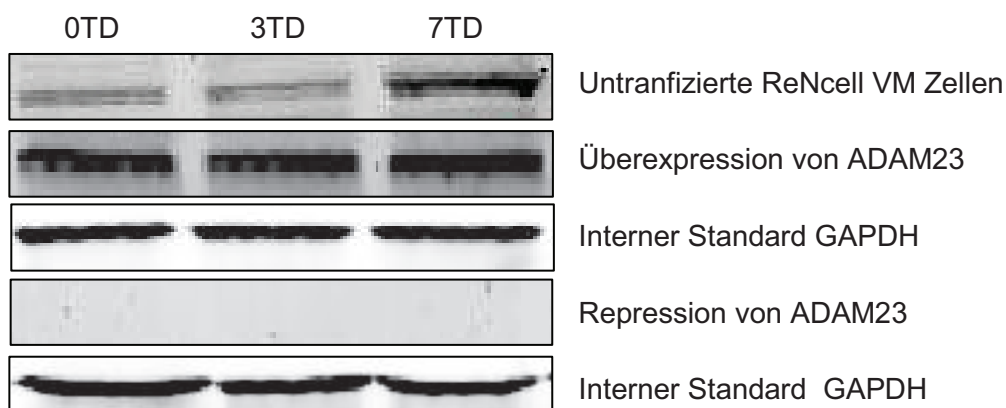


Abb. 16: Untersuchung von ReNcell VM Zellen via Western Blot mit polyklonalem ADAM23 Antikörper
Bei einer Kontrolle der Transfektion via Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Überexpression als auch die Repression von ADAM23 erfolgreich waren. Des Weiteren zeigten untransfizierte Zellen einen Anstieg von ADAM23 während der Differenzierung.

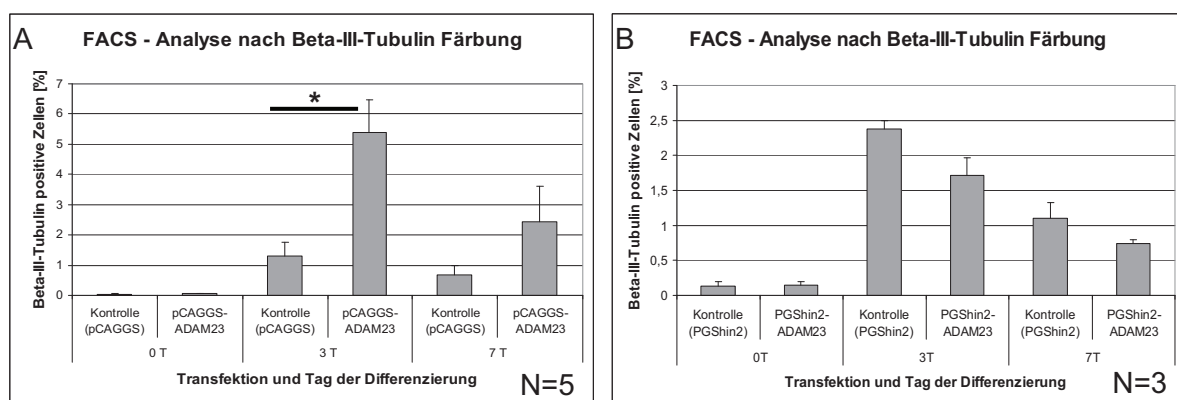


Abb. 17: FACS Analyse von ReNcell VM Zellen nach ADAM23 Transfektion

Bei einer durchflusszytometrischen Analyse konnte nachgewiesen werden, dass es zu einem signifikanten Anstieg bei Hochregulation von ADAM23 nach drei Tagen Differenzierung kommt (A). Bei einer Herunterregulation ist ein umgekehrter Effekt sichtbar, welcher jedoch nicht signifikant ist (B). Signifikanz: * $p < 0,05$

Eine Ausläuferlängenmessung über die Faserdichte, welche im Institut für Anatomie durchgeführt wurde, zeigt einen signifikanten Anstieg zwischen den Kontrollzellen mit Leervektor und den ADAM23 transfizierten Zellen nach drei Tagen Differenzierung (Abb. 18B).

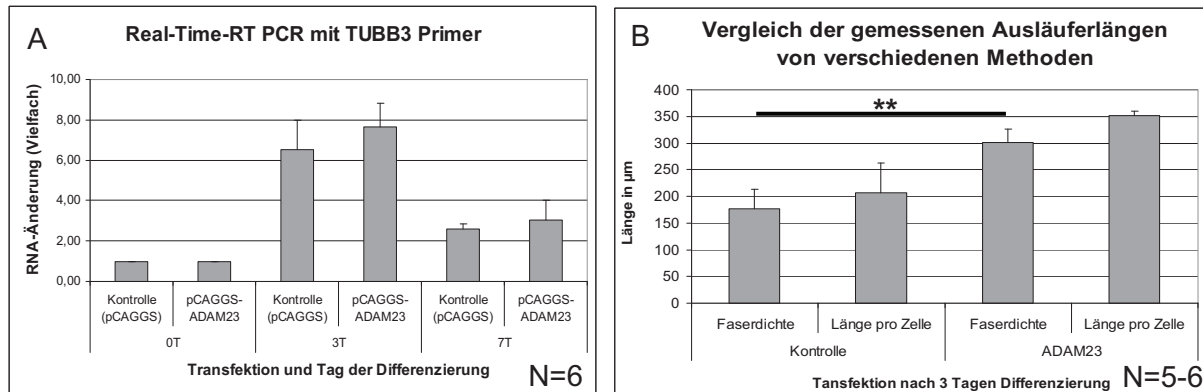


Abb. 18: Beta-III-Tubulin RNA Expression von ReNcell VM Zellen mit Hilfe von PCR (A) Vergleich Methoden Ausläuferlängenmessung (B)

Eine PCR zeigte, dass durch die Transfektion das Beta-III-Tubulin RNA-Level der Zellen nicht signifikant verändert ist. Die Messung der Zellausläufer über die Faserdichte der Zellen (Kooperation mit Anatomie) zeigte einen signifikanten Anstieg nach 3 Tagen Differenzierung von ADAM23 transfizierten Zellen zur Kontrolle. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Des Weiteren wurden die Ausläuferlängen von ReNcell VM Zellen mittels der Keyence-Software nach einer Überexpression und einer Abregulation von ADAM23 gemessen. Nach der Hochregulation von ADAM23 konnten verlängerte Ausläufer nach drei und sieben Tagen Differenzierung gemessen werden (Abb. 19A), welche signifikant waren. Bei der Herunterregulation zeigten sich signifikant verkürzte Ausläufer von ADAM23 sowohl nach drei als auch nach sieben Tagen Differenzierung (Abb. 19B).

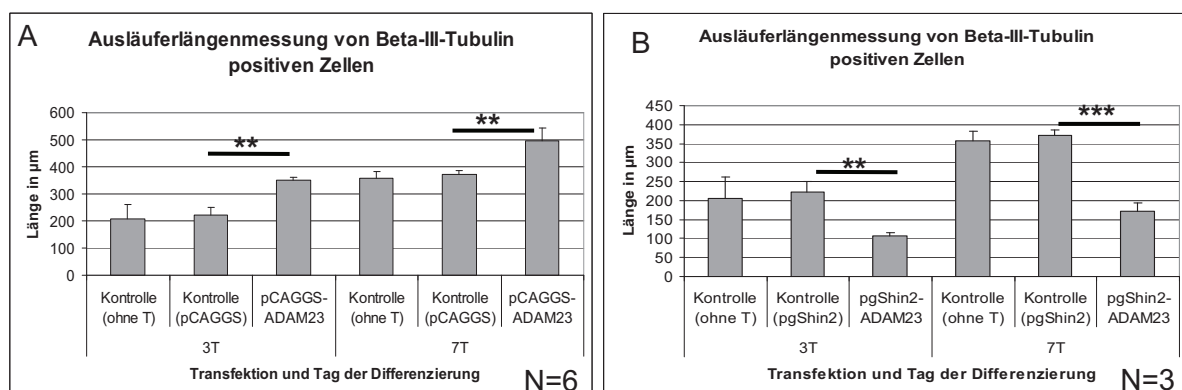


Abb. 19: Faserlängenmessung von ReNcell VM Zellen nach ADAM23 Transfektion mit Hilfe der Keyence Software bei Überexpression (A) und Repression (B)

Die Ausläuferlängen zeigten bei einer Hochregulation eine signifikante Erhöhung der Ausläuferlängen nach ADAM23 Transfektion im Vergleich zur Kontrolle jeweils nach drei und sieben Tagen der Differenzierung. Bei einer Repression von ADAM23 kam es zu einer Erniedrigung der Werte jeweils nach drei und sieben Tagen nach Beginn der Differenzierung. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Wie bei den vorhergehend analysierten Proteinen wurde die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt (Abb. 20A). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Abfall der vitalen Zellen nach Transfektion mit dem Repressionssplasmid, während die Zellzahl mit Hochregulationsplasmid keine Unterschiede zur Kontrolle mit Leervektorkonstrukt zeigte.

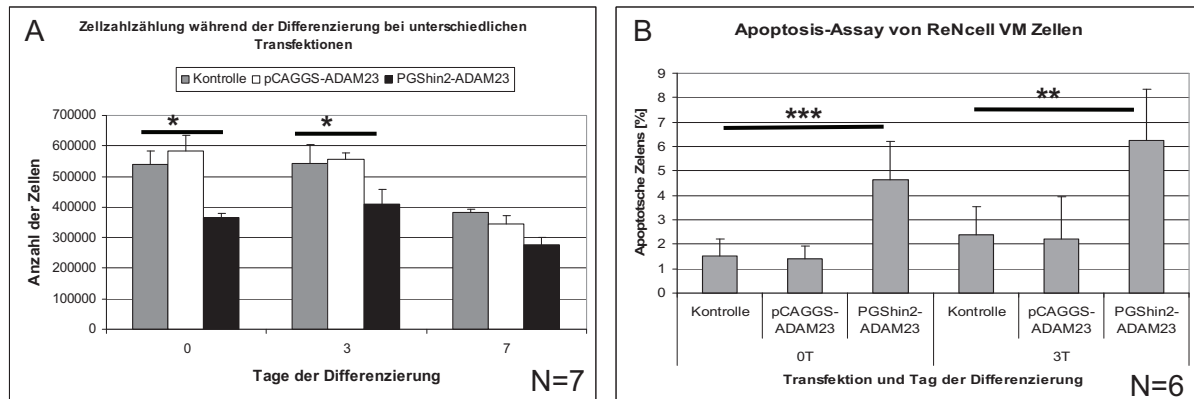


Abb. 20: Zellzahl- und Apoptosemessung von ADAM23 transfizierten Zellen

Die Messung der vitalen Zellen ergab, dass es sich bei einer Herunterregulation von ADAM23 um eine signifikante Erniedrigung der vitalen Zellen handelt. Bei der Hochregulation konnten keine signifikanten Änderungen zur Kontrolle festgestellt werden. Bei einer Kontrolle der Werte mittels Apoptosemessung konnte ermittelt werden, dass es beim Repressionssplasmid von ADAM23 es signifikant stärker zu einer Apoptose kommt. Auch hier zeigte das Überexpressionsplasmid keine Veränderungen zur Kontrolle. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

In den Experimenten zu ADAM10, 17 und 22 konnten jeweils keine Abweichungen von der Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass das Herunterregulationsplasmid sich nicht negativ auf die Zellzahl auswirkt, sondern das Fehlen von ADAM23 in der Zelle diesen Effekt auslöst. Bei der Apoptosemessung zeigt sich das gleiche Bild. Die Anzahl der apoptotischen Zellen nach einem TUNEL-Assay zeigte signifikant erhöhte Werte nach einer Transfektion mit Repressionsplasmid (Abb. 20B).

ADAM23 zeigt in der Analyse vermehrt Beta-III-Tubulin positive Zellen sowie eine Verlängerung der Ausläufer. Um zu analysieren, wie der Funktionsmechanismus hinter dieser Ausläuferverlängerung ist, wurden bei der Analyse verschiedener Bindungspartner vermehrt solche Proteine (z.B. L1 cam, Nr cam, Actin, Map2, usw.) untersucht, welche einen nachgewiesenen Einfluss auf das Wachstum von Axonen besitzen.

Dabei konnte festgestellt werden, dass das Protein L1cam (Markus et al. 2002) in ADAM23 überexprimierten Zellen verstärkt vertreten ist. Während bei der Herunterregulation von

ADAM23 ist das Proteinsignal von L1cam schwächer als bei den Kontrollzellen (Abb. 21).

Die Quantifizierung erfolgte mittels Odyssey-Software.

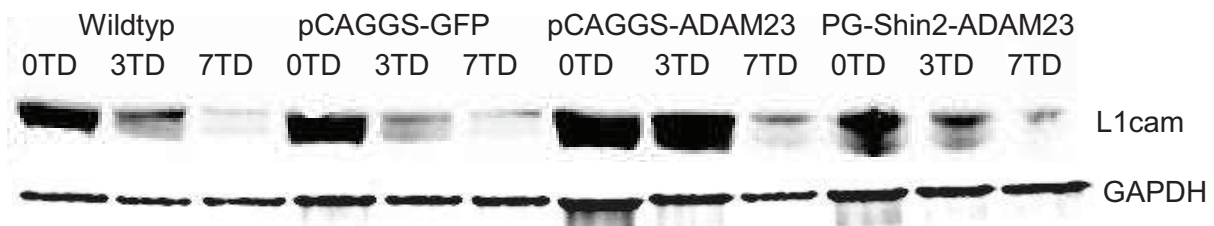


Abb. 21: Expression von L1cam nach verschiedenen Transfektionen während der Differenzierung

Zur Überprüfung der Expressionsänderung wurde je 100 µg ReNcell VM Proteinlysate von verschiedenen Tagen der Differenzierung nach unterschiedlichen Transfektionen aufgetragen. Das Anfärben erfolgte mit dem neuronalen Marker L1cam sowie der internen Kontrolle GAPDH.

3.2 Endogene Expressionsanalyse in Hühnerembryonen

3.2.1 Charakterisierung der Antikörper

Als *in vivo* System wurden Hühnerembryonen gewählt, da sie sich schnell entwickeln und einfach zu handhaben sind. Außerdem sind viele Entwicklungsstadien ähnlich der Säugerentwicklung. Um eine Analyse der Proteinexpression im sich entwickelnden Hühnergehirn durchzuführen, wurden als erstes die von Eurogentec gelieferten Antikörper auf Ihre Spezifität untersucht. Des Weiteren wurde analysiert, bei welchem Molekulargewicht die Antikörper spezifische Banden aufzeigen.

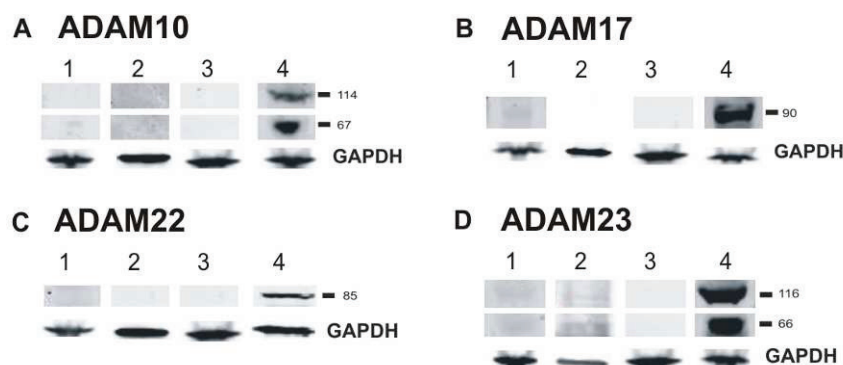


Abb. 22: Identifikation der Spezifität verschiedener ADAM-Antikörper

Proteine von Hühnergewebelysaten wurden über eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western Blots mit unterschiedlichen ADAM - Antikörpern angefärbt. Dabei ist der Slot 1 das Pre-Immuneserum des jeweiligen Antikörpers, Slot 2 der jeweilige ADAM-Antikörper gekoppelt mit dem eigenen spezifischen Antigen, Slot 3 Negativkontrolle - nur Zweitantikörper, Slot 4 der Antikörper für das jeweilige ADAM - Protein (ADAM10, 17, 22 oder 23). In allen Slots befinden sich die gleichen Lysate.

Der ADAM10 Antikörper weist je eine Bande bei 114 kDa und 67 kDa auf (Abb. 22A). Die 67 kDa Bande korreliert mit dem theoretischen Wert (NM_204261.1) der Aminosäuresequenz für das aktive Protein, welches ein Molekulargewicht von 60 kDa besitzt. Der Unterschied zwischen den Werten kann auf die Glykosylierung des muren Proteins zurück geführt werden. Hall und Erickson beschrieben 2003 ein inaktives, glykosyliertes Vollängenprotein von ADAM10 mit einer Größe von 114 kDa, welches mit der in dieser Arbeit detektieren Proteinbande übereinstimmt. Im Gegensatz dazu ist bei dem ADAM17 Antikörper nur eine Bande bei 90 kDa detektierbar, die das aktive Protein darstellt (Abb. 22B) und identisch zum theoretischen Wert ist (NM_001008682.1). Dies entspricht auch dem vom Black (2002) ermittelten Werten.

ADAM22 und ADAM23 gehören beide zu den nicht proteolytisch aktive Proteinen (Edwards et al. 2008). Im Hühnerembryo konnte für ADAM22 nur eine Bande bei 85 kDa ermittelt werden (Abb. 22C), welche dem theoretischen Wert des muren Proteins von 79 kDa entspricht (NM_001145228.1). Im Fall von ADAM23 konnten zwei Banden gefunden werden. Die 66 kDa Bande stellt das glykosylierte aktive Protein dar, welches einen theoretischen Wert von 59 kDa besitzt (NM_001145230.1). Bei der 116 kDa Bande handelt es sich um das inaktive Vollängenprotein, bei welchem ein theoretischer Wert von 85 kDa ermittelt werden konnte. Die Abweichung zwischen dem detektierten Protein und dem theoretischen Wert ist auf die Glykosylierung zurückzuführen ist (Abb. 22D).

3.2.2 Endogene ADAM - Proteinexpression während der Embryonalentwicklung

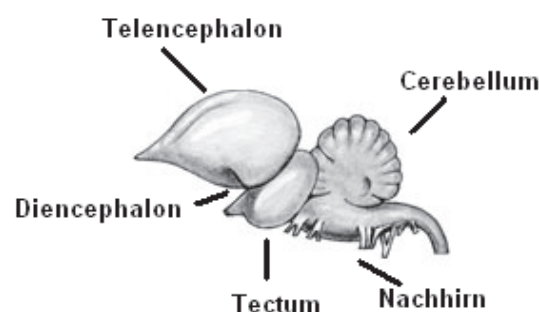


Abb. 2: Gehirn Hühnerembryo (<http://www.fotosearch.de/lifeart/tieranatomie/LIF146/>)
Abbildung der fünf verschiedenen Gehirnregionen im Hühnerembryo

Bei der Analyse der Proteinexpression im sich entwickelnden Embryo wurden Gehirnllysate aus verschiedenen Regionen des Gehirns verwendet und über Western Blot analysiert.

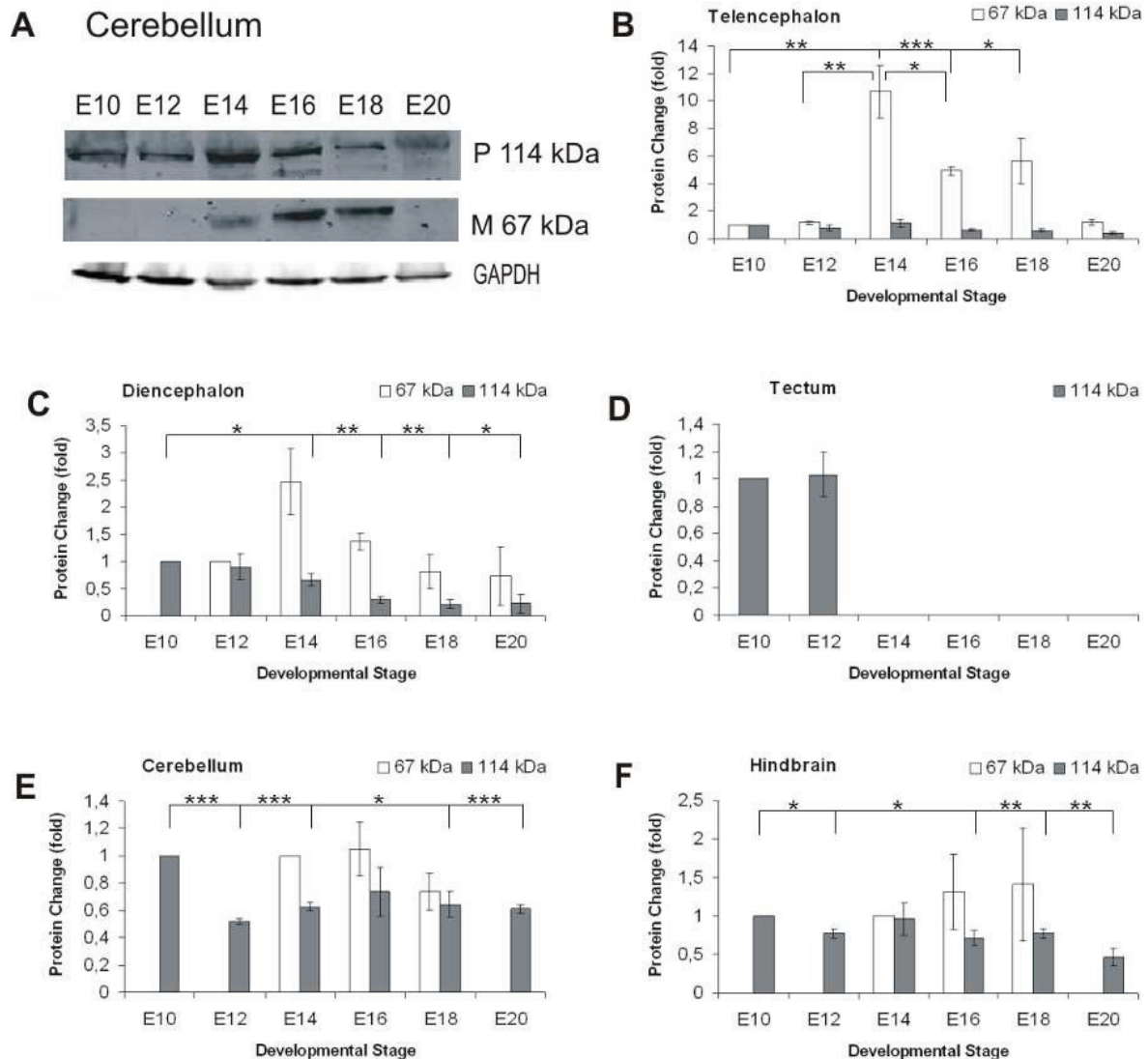


Abb. 23: ADAM10 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos

Nach einer Western Blot - Analyse wurden die verschiedenen Gehirnteile Telencephalon (B), Diencephalon (C), Tectum (D), Cerebellum (E) und Hindbrain (F) graphisch dargestellt. Dabei stellt die weiße Bande das mature Protein und die graue Bande das immature Protein dar. Zusätzlich wurde ein exemplarischer Western Blot (A) dargestellt. E10 bis E20 stellen den Tag der Entwicklung im Hühnerei dar. Bei Tag 21 schlüpft normalerweise das voll entwickelte Küken. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Als Entwicklungszeitpunkte wurden die embryonalen Stadien E10 bis E20 ausgewählt, welche die Gewebedifferenzierung der Embryoentwicklung darstellen. Die Hühnerembryonen würden am Entwicklungstag E21 voll entwickelt schlüpfen. Ein exemplarischer Western Blot des Gehirnteils Cerebellum diente in den folgenden Abbildungen als Veranschaulichung. Untersucht wurden das Telencephalon, das Diencephalon, das Tectum, das Cerebellum und das

Nachhirn (Hindbrain) (Abb. 2). Es erfolgte immer eine Darstellung der Änderung in der Proteinexpression im Vergleich zum Entwicklungsstadium E10.

Im Falle von ADAM10 (Abb. 23A) wurden die beiden Proteinbanden bei 66 kDa und 114 kDa untersucht. Im Telencephalon blieb das premature Protein (114 kDa) zwischen den Zeitpunkten E10 bis E20 konstant, während das mature Protein von E12 zu E14 um das Zehnfache ansteigt und bei E16 und E18 immer noch das Fünffache des Wertes von E12 besitzt (Abb. 23B). Danach fällt das Proteinniveau wieder auf das gleiche Niveau wie bei E12 ab.

Im Diencephalon fällt die Intensität der gemessenen inaktiven Proteinbande von E10 zu E20 beständig ab. Die aktive Bande zeigt hingegen, wie beim Telencephalon, einen sprunghaften Anstieg von E12 zu E14 (2,5-fach) und wird dann bis E20 kontinuierlich herunter reguliert (Abb. 23C).

Beim Tectum ist im Gegenzug dazu nur die immature Proteinbande zwischen E10 und E12 detektierbar (Abb. 23D). Die inaktive Proteinbande im Cerebellum ist bei E10 im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten stark vertreten und nimmt danach ab, wohingegen das aktive Protein nur bei E14 bis E18 messbar ist (Abb. 23E).

Im Nachhirn zeigt das mature Protein das gleiche Expressionsmuster wie im Cerebellum und ist von E14 bis E16 detektierbar, während das inaktive Protein die ganze Zeit von E10 bis E20 konstant vorhanden ist (Abb. 23F).

Bei ADAM17 wurde die mature Proteinbande bei 90 kDa analysiert (Abb. 24A). Dabei wurde festgestellt, dass das Protein im Telencephalon von E10 zu E16 zunimmt und danach wieder abfällt (Abb. 24B). Im Gegenzug dazu steigt die Intensität der Proteinbande im Diencephalon von E10 zu E12 an und fällt danach kontinuierlich bis E20 ab und besitzt bei E20 nur noch ca. 30 % der Intensität von E10 (Abb. 24C). Im Tectum steigt das Protein von E10 zu E12 an und nimmt danach gleich wieder ab und ist ab E16 nicht mehr messbar (Abb. 24D). Die Proteinbande im Cerebellum weist bei E10 ihre stärkste Intensität auf, welche danach signifikant stark abfällt (Abb. 24E). Im Nachhirn zeigt das Protein das gleiche Expressions-

muster wie im Diencephalon und im Tectum. Die Proteinmenge steigt von E10 zu E12 an und fällt danach wieder ab (Abb. 24F).

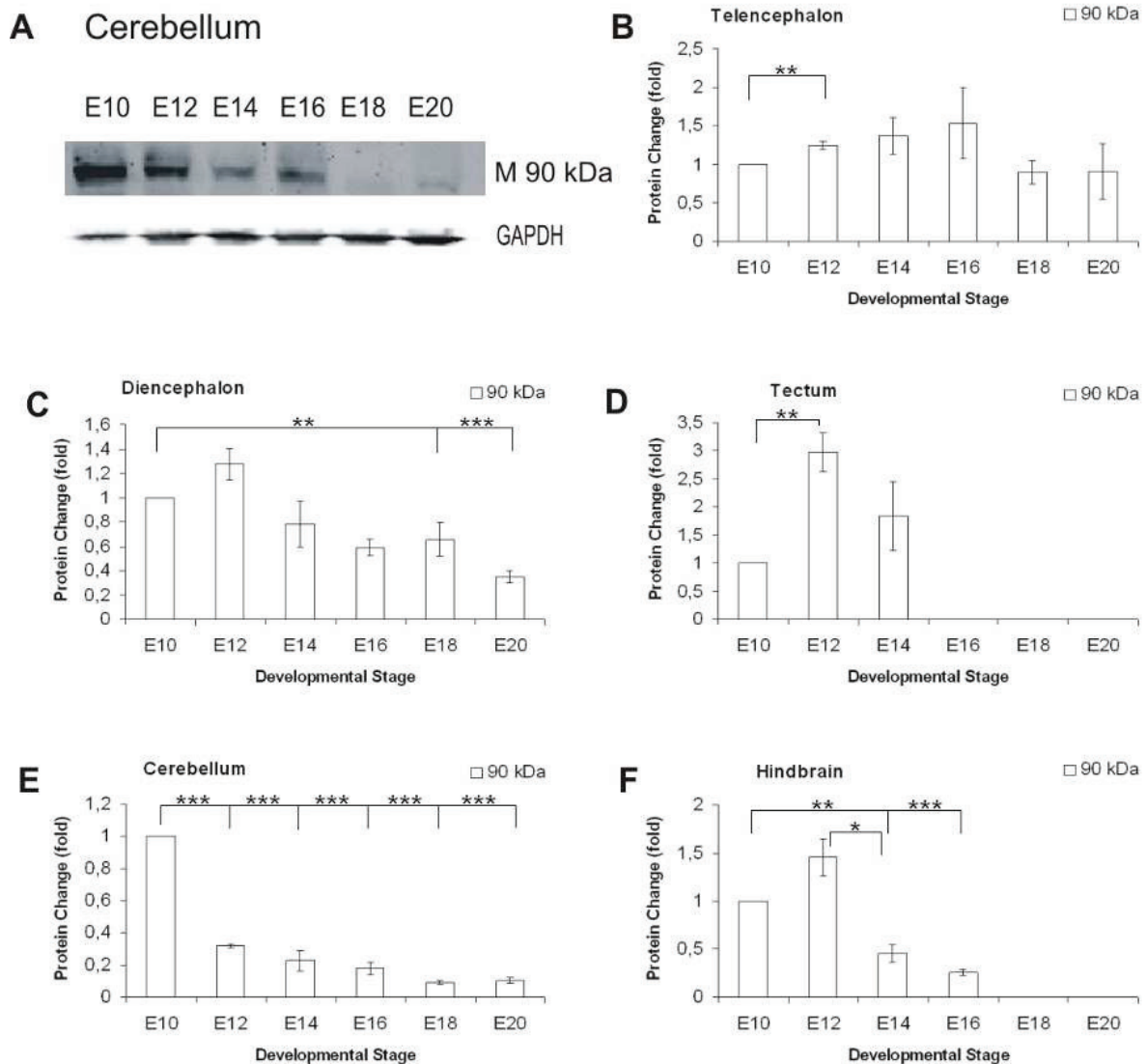


Abb. 24: ADAM17 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos

Nach einer Western Blot - Analyse wurden die verschiedenen Gehirnteile Telencephalon (B), Diencephalon (C), Tectum (D), Cerebellum (E) und Hindbrain (F) graphisch dargestellt. Dabei stellt die weiße Bande das mature Protein dar. Des Weiteren wurde ein exemplarischer Western Blot (A) dargestellt. E10 bis E20 stellen den Tag der Entwicklung im Hühnerembryo dar. Bei Tag 21 schlüpft in der Regel das voll entwickelte Küken. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Im sich entwickelnden Hühnergehirn ist nur die mature ADAM22 Proteinbande bei 85 kDa messbar (Abb. 25A). Dabei wird die Expression im Telencephalon kontinuierlich reduziert und ist bei E20 nicht mehr messbar (Abb. 25B). Im Diencephalon wird die ADAM22 Proteinkonzentration von E10 zu E20 verringert und zeigt bei E20 nur noch 30 % des Anfangswertes von E10 (Abb. 25C). Dahingegen ist die Proteinbande im Tectum nur bei E10 und E12

detektierbar (Abb. 25D). Im Cerebellum wird das Protein kontinuierlich reduziert und besitzt bei E20 nur noch 50 % der Proteinintensität von E10 (Abb. 25E), während das Protein im Nachhirn von E10 zu E12 ansteigt und danach beständig abnimmt (Abb. 25F).

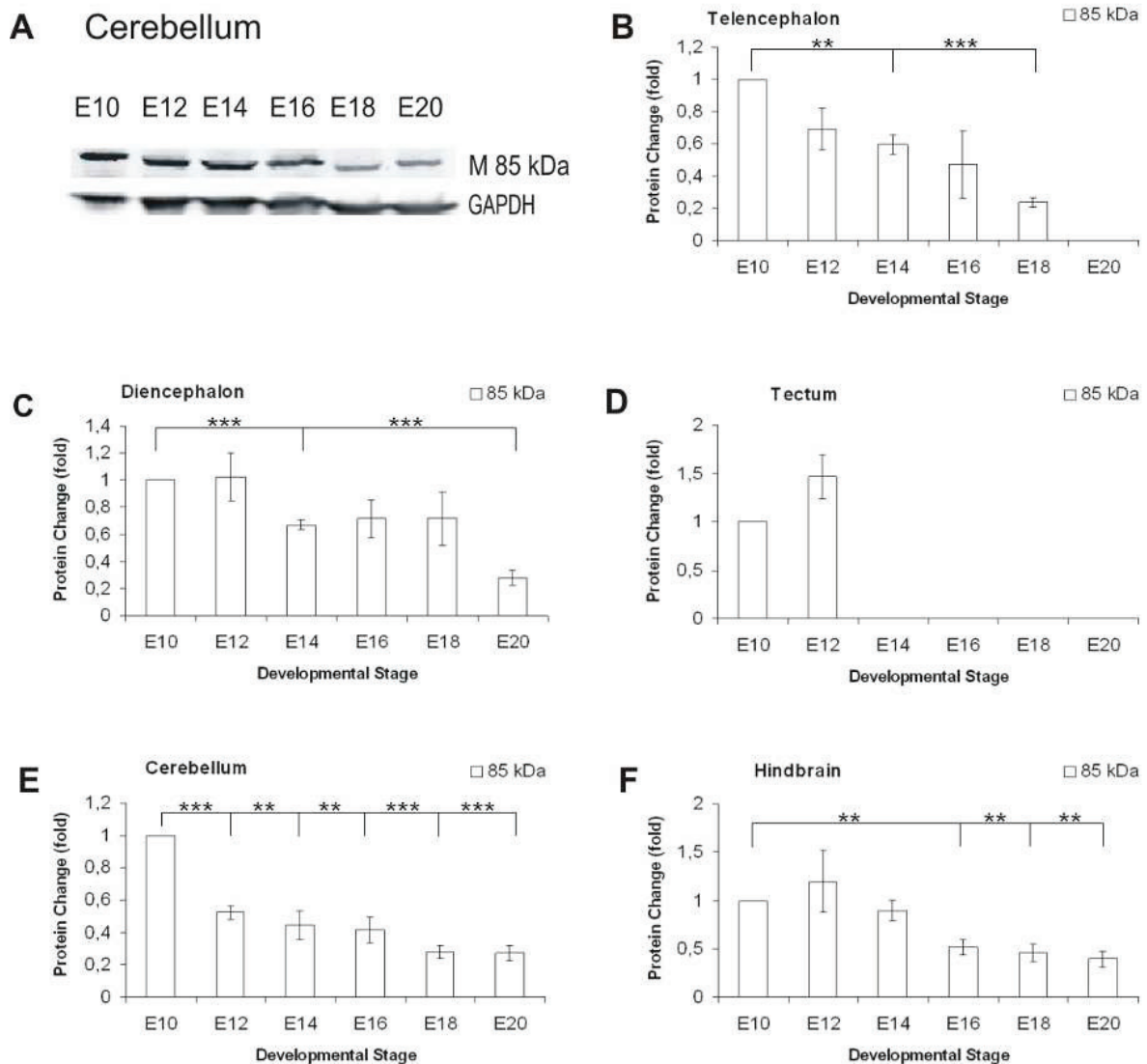


Abb. 25: ADAM22 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos

Nach einer Western Blot - Analyse wurden die verschiedenen Gehirnteile Telencephalon (B), Diencephalon (C), Tectum (D), Cerebellum (E) und Hindbrain (F) graphisch dargestellt. Dabei stellt die weiße Bande das mature Protein dar. Darüber hinaus wurde ein exemplarischer Western Blot (A) dargestellt. E10 bis E20 stellen den Tag der Entwicklung im Hühnerei dar. Bei Tag 21 schlüpft normalerweise das voll entwickelte Küken. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Bei ADAM23 wurden zwei unterschiedliche Banden bei 66 kDa und 116 kDa untersucht (Abb. 26A). Dabei konnte im Telencephalon ein Anstieg des maturen Proteins von E10 zu

E14 festgestellt werden, gefolgt von einem Abfall der Konzentration von E14 bis E20 (Abb. 26B).

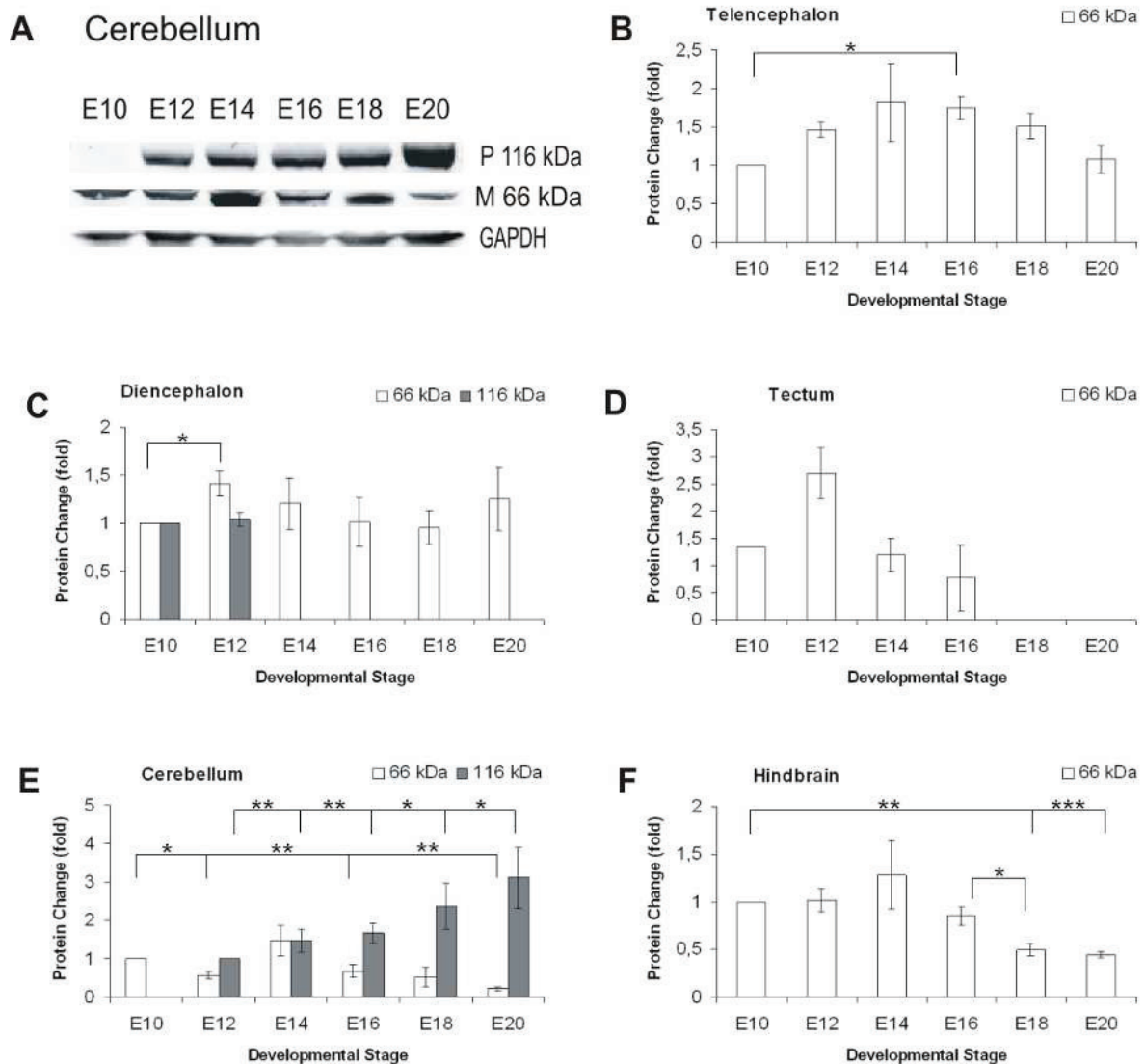


Abb. 26: ADAM23 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos

Nach einer Western Blot - Analyse wurden die verschiedenen Gehirnteile Telencephalon (B), Diencephalon (C), Tectum (D), Cerebellum (E) und Hindbrain (F) graphisch dargestellt. Dabei stellt die weiße Bande das mature Protein und die graue Bande das immature Protein dar. Des Weiteren wurde ein exemplarischer Western Blot (A) dargestellt. E10 bis E20 stellen den Tag der Entwicklung im Hühnerei dar. Bei Tag 21 schlüpft normalerweise das voll entwickelte Küken. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Im Diencephalon konnte die immature Proteinbande bei E10 und E12 detektiert werden. Das aktive Protein zeigt von E10 zu E12 eine Intensitätssteigerung und wird danach konstant exprimiert (Abb. 26C). Im Tectum zeigt das mature Protein einen Anstieg von E10 zu E12 und danach einen rapiden Abfall bis E16 und ist danach nicht mehr detektierbar (Abb. 26D). Im Gegenzug dazu, wird das aktive Protein konstant von E10 bis E20 produziert, während

das inaktive Protein einen Anstieg von E12 bis E20 verzeichnet (Abb. 26E). Im Nachhirn wird wiederum nur das mature Protein exprimiert und dies zeigt einen Anstieg der Intensität von E10 bis E14, gefolgt von einer Abnahme bis E20 (Abb. 26F).

3.3 Analyse von ST14A Zellen

Die endogene Expressionsuntersuchungen in Hühnerembryonen weisen auf eine Funktion von ADAM10, ADAM17, ADAM22 und ADAM23 im sich entwickelnden Gehirn hin. Um zu prüfen, ob diese Effekte auch in anderen Spezies beobachtet werden können, wurden ST14A Zellen (Rattenzellen aus dem Striatum) verwendet. ST14A Zellen werden wie die ReNcell VM Zellen als Monolayer kultiviert und stellen somit das Bindeglied zwischen den humanen ReNcell VM Zellen und den Hühnergeweben dar.

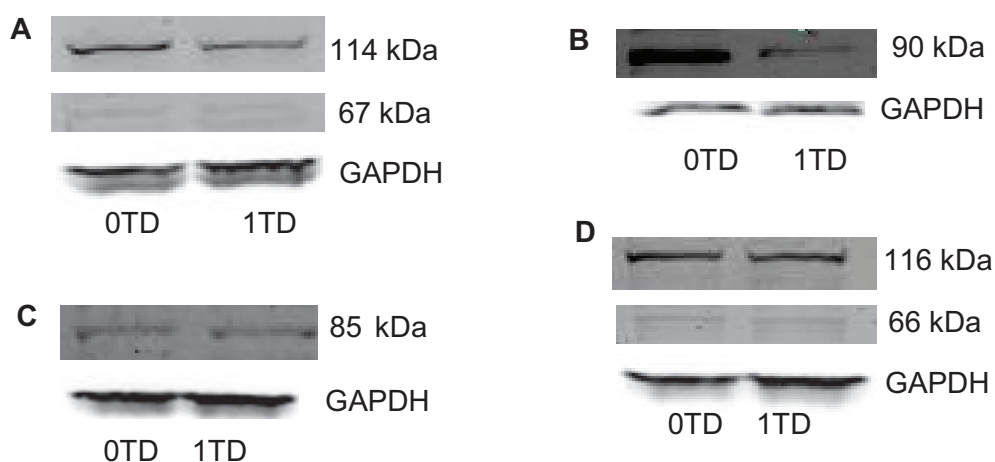


Abb. 27: Untersuchung von ST14A Zellen mit verschiedenen ADAM-Antikörpern bei Proliferation und Differenzierung

Expressionsanalyse von verschiedenen ADAM-Proteinen während der Differenzierung von Zellen aus dem Rattenstriatum. Dabei wurde ADAM10 (A), ADAM17 (B), ADAM22 (C) und ADAM23 (D) untersucht.

Im Falle von ADAM10 konnten beide Proteinbanden nachgewiesen werden (Abb. 27A). Die aktive Proteinbande konnte aber nur sehr schwach detektiert werden, genau wie bei vielen Stadien der Hühnerembryonen (Abb. 23). Die Menge an produzierten ADAM17 in den ST14A Zellen nimmt mit dem Eintritt der Differenzierung ab (Abb. 27B), welches auch beim Hühnergehirn beobachtet werden konnte (Abb. 24).

ADAM22 konnte bei der Untersuchung von ST14A Zellen sowohl bei Proliferation, als auch bei Differenzierung im gleichen Maße detektiert werden (Abb. 27C) und auch beim Hühnerembryo (3.2) konnte das Protein bei fast allen Stadien gemessen werden (Abb. 25). Bei ADAM23 wurden zwei Proteinbanden wie bei den Embryogehirnen (Abb. 26) gefunden, wobei die aktive Proteinbande aber nur sehr schwach detektiert werden konnte (Abb. 27D).

3.4 Analyse von transfizierten Hühnerembryonen

Da ADAM23 von den vier analysierten Proteinen den größten Effekt auf die Differenzierung von ReNcell VM Zellen besaß, wurden die Transfektionen der Embryonen mit ADAM23 durchgeführt. Dabei wurden die Embryonen mit pCAGGS-GFP ko-transfiziert, um eine Positivkontrolle für die überexprimierte Region zu haben (Abb. 28). Als Region wurde das Tectum/ Cerebellum ausgewählt, da es äquivalent zu der Region ist, welche für die Gewinnung der ReNcell VM Zellen genutzt wurde.

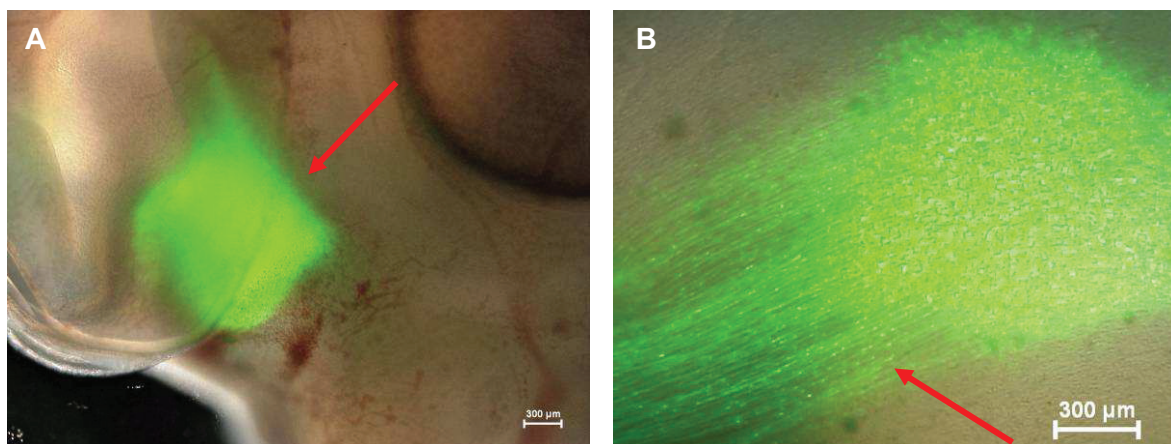


Abb. 28: Mit ADAM23 Überexpressionsvektor transfizierte Hühnerembryos

Die Embryonen wurden am embryonischen Tag vier transfiziert und die Proben nach mindestens zwei Tagen Inkubation bei 37°C gesammelt. Nach den Probenahmen konnte überprüft werden, ob die Transfektion an der richtigen Stelle erfolgt ist. Gewünscht war eine Transfektion im Bereich Tectum/ Cerebellum, wie es bei einem Embryo mit Stadium E6 (A) erkennbar ist. Nach acht Tagen Transfektion konnte eine Zellmigration (B) beobachtet werden. Die Balken stellen jeweils eine Größe von 300 µm dar.

Nach dem Fixieren und Schneiden der Embryonen in 20 µm dicke Gewebeschnitte konnten Färbungen mit unterschiedlichen neuronalen Markern durchgeführt werden. Bei der Färbung von Entwicklungsstadium E6 konnte ein Anstieg an Beta-III-Tubulin positiven Zellen verzeichnet werden, wohingegen bei den Kontrollembryos, welche mit dem pCAGGS Leervektor transfiziert wurden, keine eindeutige Färbung zu erkennen war (Abb. 29).

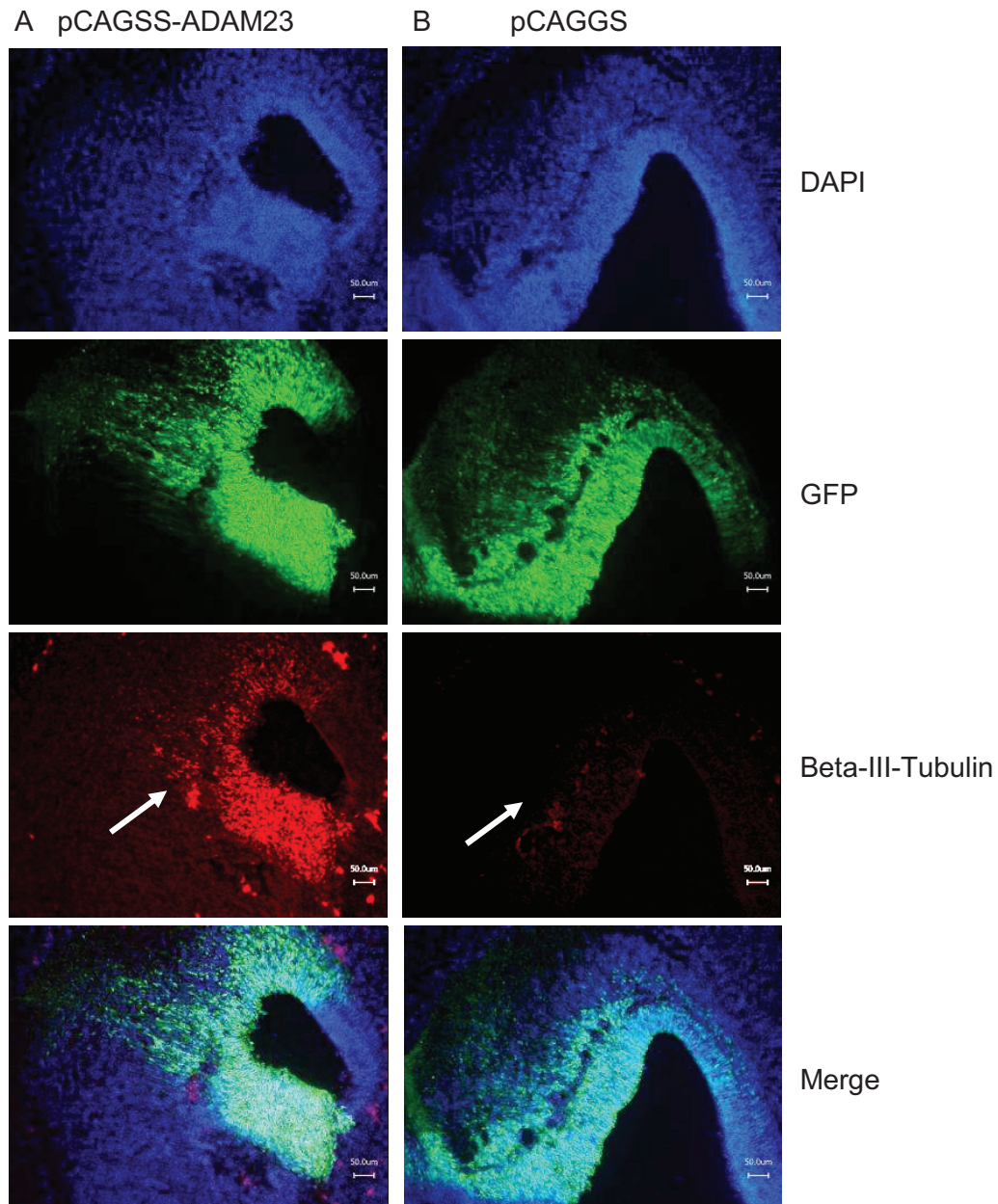


Abb. 29: Cerebellum eines Hühnerembryo an Embryonaltag 6 nach Beta-III-Tubulin Färbung

Die Embryonen wurden am embryonalen Tag 4 transfiziert und die Proben wurden nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C fixiert und danach wurden die Embryogehirne in 20 μm dicke Scheiben geschnitten. Gegenübergestellt wurden Embryonen mit ADAM23 Überexpression (A) und Transfektion mit Leervektor (B). Blau ist die Zellkernfärbung (DAPI), grün die GFP Expression als Kontrolle und rot ist die Beta-III-Tubulin Färbung. Beide Schnitte zeigen das Mittelhirnareal. Die Balken stellen jeweils eine Größe von 50 μm dar.

Im Gegensatz zu dem Marker für reife Neurone (Beta-III-Tubulin) zeigt sich bei einer Färbung mit dem frühen neuronalen Marker HUC/D, dass überall im Gewebe der frühe neuronale Marker exprimiert wird (Abb. 30).

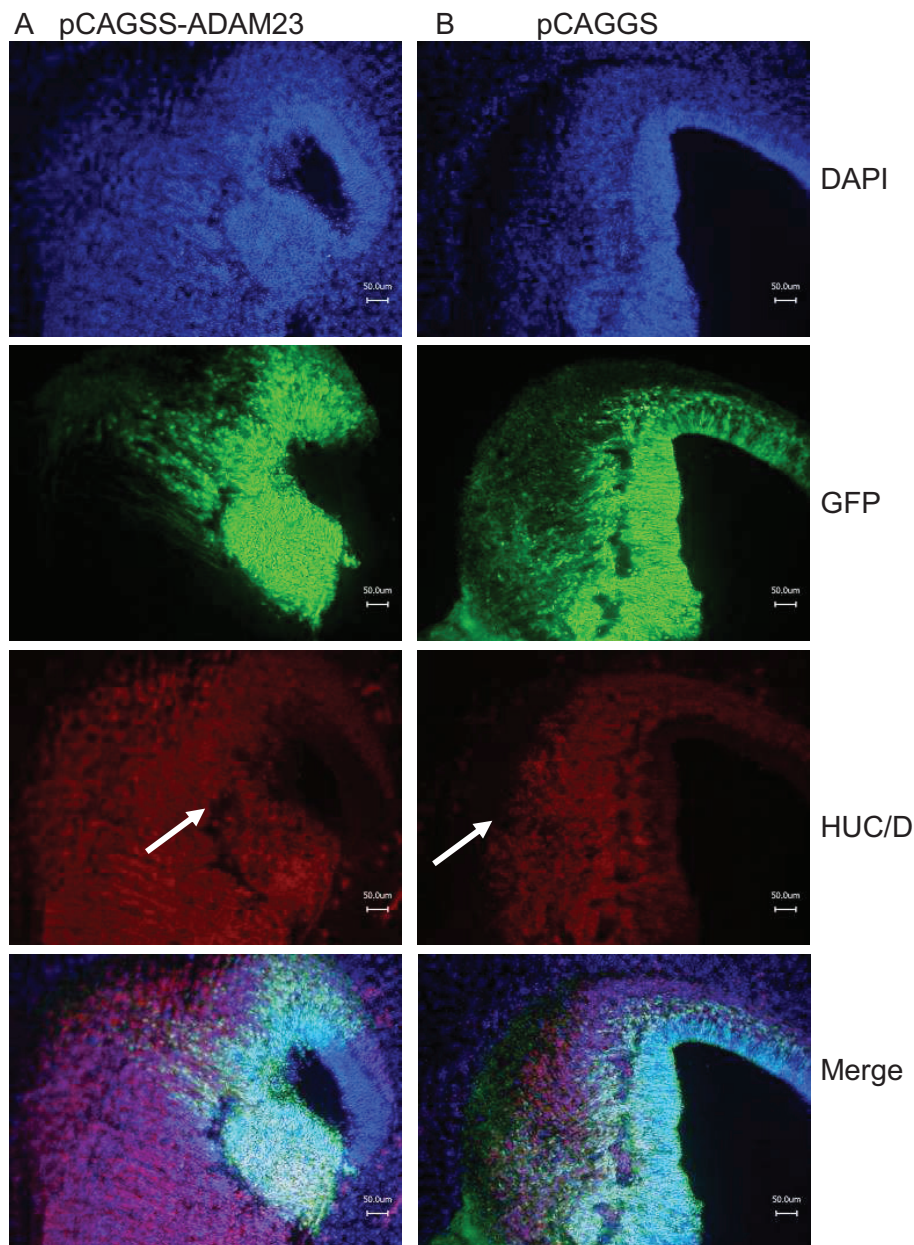


Abb. 30: Cerebellum eines Hühnerembryo an Embryonaltag 6 nach HUC/D Färbung

Die Embryonen wurden am embryonischen Tag 4 transfiziert und die Proben wurden nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C fixiert und danach wurden die Embryogehirne in 20 μm dicke Scheiben geschnitten. Gegenübergestellt wurden Embryos mit ADAM23 Überexpression (A) und Transfektion mit Leervektor (B). Blau ist die Zellkernfärbung (DAPI), grün GFP-Expression als Kontrollregion und rot ist die HUC/D Färbung. Beide Schnitte zeigen das Mittelhirnareal. Die Balken stellen jeweils eine Größe von 50 μm dar.

3.5 Genexpressionsanalyse nach ADAM23 - Transfektion

Um die Effekte von ADAM23 *in vivo* und *in vitro* besser beschreiben zu können, wurden die RNA-Änderungen untersucht, welche durch die Transfektionen mit verschiedenen Vektoren ausgelöst wurden. Hierzu wurden die verschiedenen RNA - Level mittel Microarrays, nach

Überexpression und Repression von ADAM23 in ReNcell VM Zellen gemessen und die Unterschiede dargestellt.

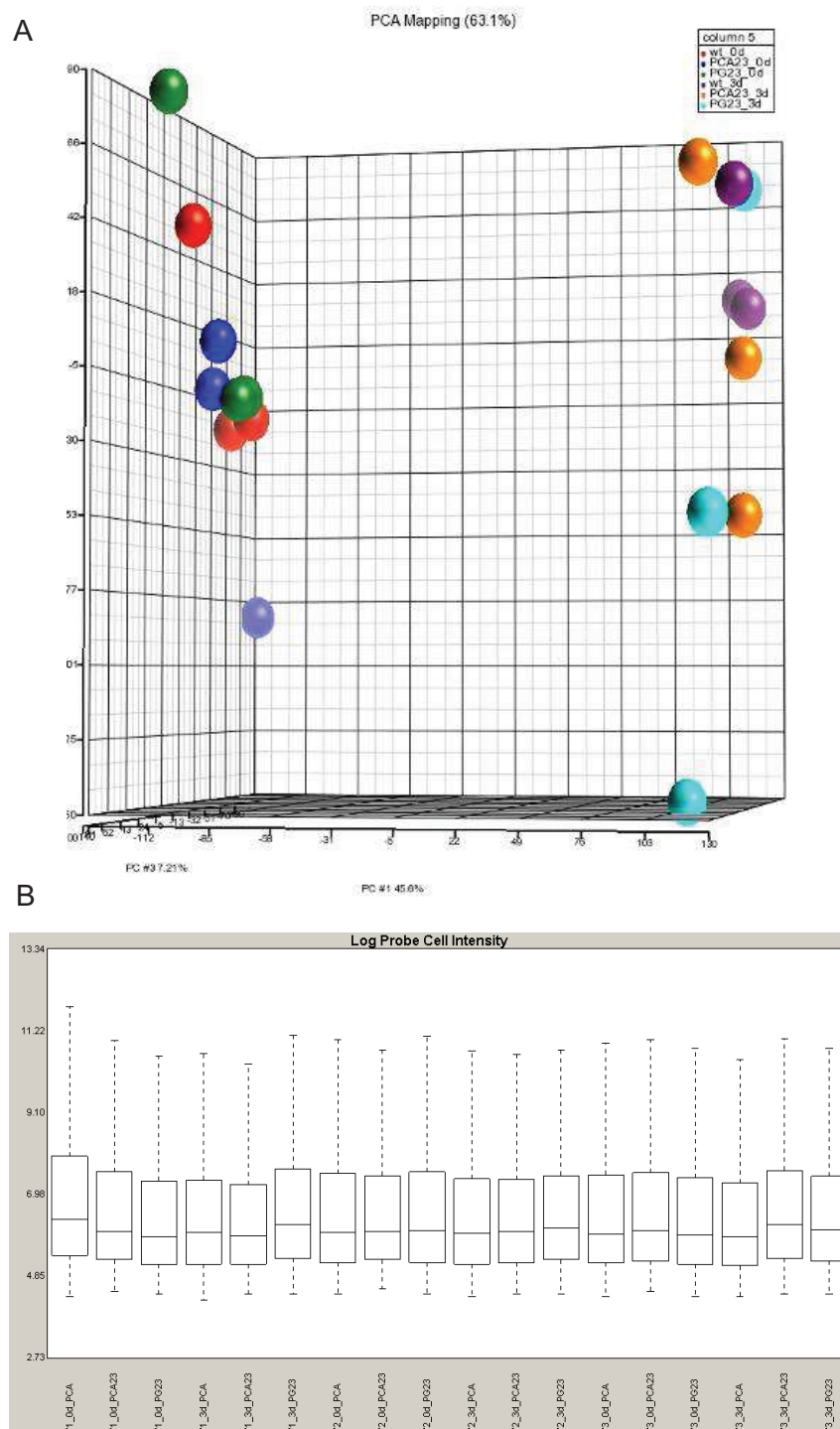


Abb. 31: Microarray mit ReNcell VM Zellen

Durchführung von Microarrays mit ReNcell VM Zellen zeigen zwischen null Tagen und drei Tagen nach Beginn der Differenzierung eine vermehrte Genamplifizierung (A), welches durch die unterschiedliche Lokalisierung der einzelnen Microarrays von Tag null (links) und und Tag drei (rechts) sichtbar wird. Die Durchführung der Mikroarrays verlief stabil. Dies wurde durch die Kontrollen in den einzelnen Microarrays dargestellt (B).

Durch die Zuhilfenahme der internen Kontrollen auf den verschiedenen Microarray konnten technisch bedingte Unterschiede ausgeschlossen werden (Abb. 31B). Ein Sprung in der Amplifizierung der Gesamtgene zeigt deutliche Veränderungen zwischen Tag null und Tag drei. Bei Tag drei (Cyan, Orange, Lila) stehen die jeweils drei unabhängigen Experimente einer Transfektion realtiv nah beieinander, was schon im Vorfeld auf die Ähnlichkeit der gleichen Bedingungen schließen lässt (Abb. 31A).

Nach der Auswertung von jeweils drei unabhängigen Versuchen der verschiedenen Transfektionen konnten signifikante Unterschiede detektiert werden. Dabei stellt das bei der Überexpression von ADAM23 erhöhte L1cam ein Protein dar, welches im Wachstumskegel der Axone vorkommt und somit auf das Axonwachstum wirkt. Das Gen Meteorin ist um das ca. 1,55 - fache signifikant erhöht. Meteorin hat einen Einfluss auf die Differenzierung und das Axonwachstum (Nishino et al. 2004) von Zellen (Abb. 32A). Bei einem Silencing von ADAM23 wird das apoptotische Gen TRAIL signifikant ca. um das 7 - fache erhöht, welches in Interaktion mit Caspase 3 (ca. 1,5 - fach erhöht) die Apoptosekaskade in der Zelle einleitet (Porter et al. 1999). Dies unterstützt die Ergebnisse der Apoptoseuntersuchung aus Abb. 18B. Des Weiteren ist TNR (Tenascin-R) signifikant um da 3 - fache herunterreguliert, welches ein Protein ist, dass primär im Zentralen Nervensystem exprimiert wird (Xiao et al. 1997). Das Gen NKAIN3 kodiert die Natrium-Kalium-Pumpe3. Dieses Gen ist auch signifikant (ca. 1,9 - fache) bei PGShin-2 ADAM23 herunterreguliert (Abb. 32B).

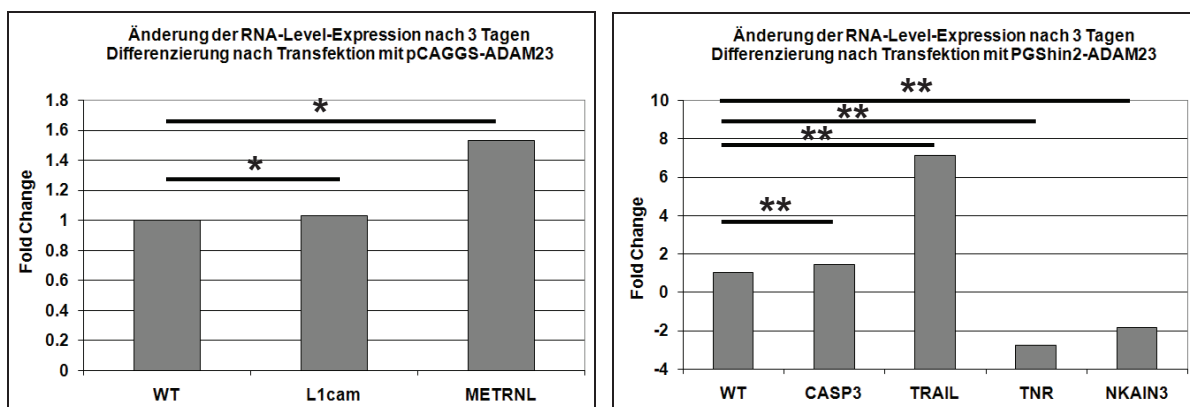


Abb. 32: Auswertung der Microarrays mit ReNcell VM Zellen nach 3 Tagen Differenzierung

Nach einer Überexpression sind Gene wie L1cam und Meteorin signifikant erhöht (A), wohingegen bei einer Herunterregulation die apoptotischen Gene Caspase3 und TRAIL signifikant erhöht werden und Gene für TNR und NKAIN3 signifikant erniedrigt sind. Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Neben den Werten nach drei Tagen Differenzierung wurden auch Veränderungen zwischen null und drei Tagen Differenzierung miteinander verglichen (Abb. 33).

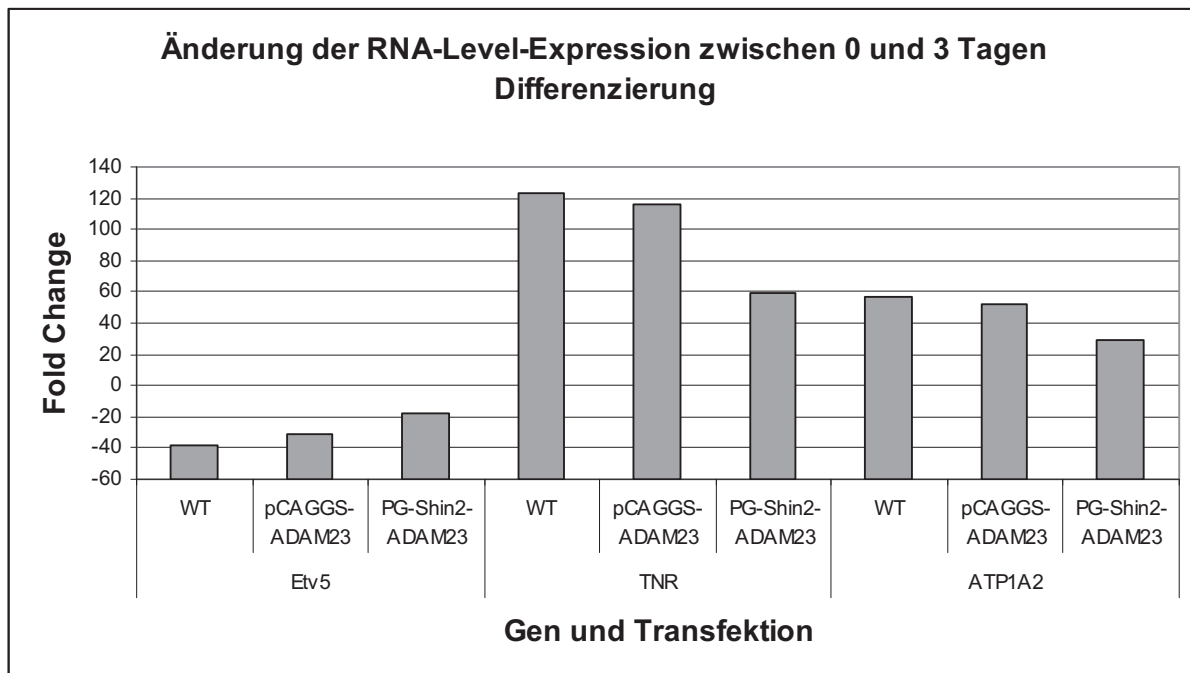


Abb. 33: Auswertung der Microarrays mit ReNcell VM Zellen zwischen 0 und 3 Tagen Differenzierung

Genanalyse zeigt ReNcell VM Zellen nach unterschiedlichen Transfektionen. Eine Herunterregulation von ADAM23 zeigt eine verminderte Expression von TNR und AP1A2 im Zuge der Differenzierung. Etv5 hingegen ist noch verstärkt produziert. Die Zellen mit ADAM23 Überexpression zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Kontrollzellen. Alle Werte sind im Vergleich zwischen null und drei Tagen Signifikant ($p < 0,001$).

Etv5, welche zu der ETS Transkriptorenfamilie gehört, wird im Rahmen der Differenzierung herunter reguliert, was zu einer Abnahme der Proliferation führt (Tyagi et al. 2009). Dabei wird das Gen in den ReNcell VM Zellen mit einem ADAM Silencing nur um ca. das 20 - fache herunter reguliert, während die Hochregulation von ADAM23 und die Kontrollzellen bis um das 40 - fache herunterreguliert werden. Das Gen TNR (Tenascin-R), welches u. a. auch die Neuritenformation fördert (Volkmer et al. 1998), wurde im direkten Vergleich bei drei Tagen Differenzierung bei einer Abregulation von ADAM23 stark herunterreguliert (Abb. 32). Beim Vergleich zwischen null und drei Tagen Differenzierung zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 33). Während in Kontrollzellen und mit pCAGGS-ADAM23 transfizierten Zellen die Genamplifizierung um das bis zu 120 - fache erhöht, wird das Gen TNR bei einer Herunterregulation von ADAM23 nur ca. 60 - fach erhöht (Abb. 33). ATP1A2 gehört zu den ATPase Na^+/K^+ Transportergenen, welche auch für die elektronische Erregbarkeit von Nerven verantwortlich sind (Dunbar et al. 2001). Dieses Gen wird bei der Überexpression von ADAM23

und den Kontrollzellen bis zu 50 - fach hochreguliert. PG-Shin2-ADAM23 transfizierte Zellen weisen hingegen nur eine Hochregulation um ca. das 30 - fache auf (Abb. 33).

Eine Standardabweichung wird in den Diagrammen nicht dargestellt, da die Microarray - Software (Affymetrix) nur den Unterschied zwischen den Microarrays und deren Signifikanzen darstellt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten alle Vektoren für die Hoch- und Herunterregulation der verschiedenen ADAM-Proteine erfolgreich kloniert und exprimiert werden. Nach der *in vitro* Tranefektion von ReNcell VM Zellen wurden diese Zellen wie in der Literatur (Schmöle et al. 2010) beschrieben proliferiert und anschließend durch den Entzug der Wachstumsfaktoren erfolgreich differenziert.

4.1 Einfluss von ADAM10 auf die Differenzierung

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Metalloprotease ADAM10 das Axonwachstum beeinflusst und das ADAM10 eine Rolle während der Neurogenese besitzt (Hattori et al. 2000, Schimmelpfeng et al. 2001, Fambrough et al. 1996, Rooke et al. 1996, Chen et al. 2007). In Hühnerembryonen zeigte sich eine verstärkte Expression von ADAM10 zwischen dem embryonalen Stadien E14 und E18, bei welchen laut Zamenhof et al. (1978) verstärkt die Differenzierung im Vordergrund steht. Dies bestätigt den in der Literatur beschriebenen Effekt, dass ADAM10 eine Rolle während der Differenzierung und somit der Neurogenese hat.

Diese Effekte auf ReNcell VM Zellen konnten jedoch nur bedingt nachgewiesen werden. So zeigte eine Überexpression von ADAM10 keine signifikante Änderung der Anzahl der Beta-III-Tubulin positiven Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 5A). Dies lässt darauf schließen, dass eine Überexpression von ADAM10 keine positiven Auswirkungen auf die Differenzierung von ReNcell VM zu Neuronen besitzt.

Im Gegensatz dazu zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Ausläuferlänge von Beta-III-Tubulin positiven Zellen nach sieben Tagen Differenzierung von 350 µm der Kontrollzellen auf 410 µm bei mit ADAM10 transfizierten Zellen (Abb. 5B). Der positive Effekt von ADAM10 auf die Ausläuferlänge wurde bereits in *Drosophila* beschrieben. Fambrough et al. (1996) zeigte, dass es durch die Repression von ADAM10 in *Drosophila*embryos zu einer Vermin-

derung des Axonwachstums im zentralen Nervensystem kommt. Weiterführend wurde der positive Einfluss von ADAM10 auf die Wachstumskegel im gleichen Tiermodell von Schimelpfeng et al. (2001) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die Zellzahl der vitalen Zellen zu verschiedenen Stadien der Differenzierung gemessen, um zu überprüfen, ob ADAM10 einen zusätzlichen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der humanen Vorläufer Zellen besitzt, da u. a. in der Literatur beschrieben wurde, dass Wachstumsfaktoren wie Betacellulin, EGF und HB-EGF zu den ADAM10 Substraten (Sahin et al. 2004) gehören. Bei der Messung der vitalen Zellen konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrolle gemessen werden (Abb. 5C).

Neben den Untersuchungen zur Proliferation und Differenzierung wurde des Weiteren geprüft, ob ADAM10 zu einer verstärkten Akkumulation von Beta-Catenin aus dem Zytosol in den Nukleus führt. Der von Reiss et al. (2005) beschriebene Effekt von ADAM10 in Mausfibroblasten konnte während der Differenzierung der humanen Vorläuferzellen nicht bestätigt werden. Zwar wurde Beta-Catenin während der Differenzierung verstärkt in allen zellulären Subfraktionen detektiert, aber es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle, Stimulation und Repression von ADAM10 nachgewiesen werden (Abb. 6). In der Literatur (Reiss et al. 2005) ist beschrieben, dass die Spaltung von N-Cadherin mit Hilfe von ADAM10 in Konkurrenz mit den WNT-Signalwegen, zur Beta-Catenin-Akkumulation im Zellkern, steht. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass diese Wege zur Beta-Catenin-Akkumulation einerseits im Gleichgewicht stehen und eine verstärkte Beta-Catenin Freisetzung von der Membran zu einer verringerten Akkumulation von Beta-Catein durch den WNT-Signalweg führt. Andererseits könnte der ADAM10 Signalweg durch die vorhandene Menge an N-Cadherin in der Membran limitiert werden. Beides könnte eine Erklärung für die nicht detektierbaren Unterschiede bei der Hoch- bzw. Herunterregulation von ADAM10 sein.

Zusammenfassend kann der Einfluss von ADAM10 auf die Ausläuferlänge bestätigt werden, wohingegen eine Überexpression von ADAM10 sich nicht signifikant auf die Anzahl der zu Neuronen differenzierten Zellen auswirkte. Die von Hartmann et al. (2002) beschriebenen Ent-

wicklungsdefekte der Neurogenese bei Mäusen, durch die Herunterregulation von ADAM10, müsste in nachfolgenden Studien an den humanen neuronalen Vorläuferzellen noch überprüft werden.

4.2 Einfluss von ADAM17 auf die Differenzierung

Die in der Literatur auch als TACE benannte Metalloprotease ADAM17 hat u. a. Effekte auf Zellwachstum, Proliferation und Zellmigration (Kenny et al. 2007, Shah et al. 2006, Lautrette et al. 2005). Diese Effekte zeigten sich auch bei der Differenzierung von ReNcell VM Zellen, wobei das Protein von proliferierenden Zellen verstärkt produziert wird wohingegen die Expression während der Differenzierung kontinuierlich abnimmt und letztendlich nicht mehr detektierbar ist (Abb. 8). Dieser Effekt zeigte sich auch bei anderen Modellen wie den ST14A Zellen (Abb. 27B) und Hühnerembryonen (Abb. 24) während der Differenzierung. Laut Zamenhof et al. (1978) ist der Großteil der Proliferation an Entwicklungstag E10 der Hühnerembryonen abgeschlossen und es folgt vermehrt die Differenzierung. Durch die gemessenen Werte konnten die Aussagen aus der Literatur, dass ADAM17 vorrangig einen Einfluss auf der Proliferation ausübt, bestätigt werden.

Untersuchungen nach der Transfektion der ReNcell VM Zellen konnten belegen, dass eine Überexpression von ADAM17 keine signifikanten Unterschiede bei der Differenzierung von humanen Vorläuferzellen zu Neuronen besitzt (Abb. 9A), wohl aber die Repression von ADAM17. Bei der Abregulation von ADAM17 kommt es zu einer Verminderung der Neuronenzahl auf nur 50% der Kontrollzellen (Abb. 9B). Parallel dazu zeigt sich bei mikroskopischen Aufnahmen, dass ReNcell VM Zellen mit dem Herunterregulationsvektor einen veränderten Phänotyp aufweisen (Abb. 7). Dies weist darauf hin, dass ADAM17 nicht nur einen Effekt auf die Proliferation, sondern auch auf die Art der Differenzierung besitzt.

Bei der anschließenden Überprüfung der Ausläuferlängen konnte gezeigt werden, dass bei einer Hochregulation von ADAM17 in den ReNcell VM Zellen es zu einer verminderten Aus-

läuferlänge kommt. Nach drei Tagen Differenzierung haben ADAM17 stimulierte Zellen nur eine Ausläuferlänge von ca. 140 μm Länge, während die Kontrollzellen eine Länge von ca. 210 μm aufweisen. Nach sieben Tagen Differenzierung ist die Ausläuferlänge der Kontrollzellen ca. 360 μm , wohingegen bei Zellen mit ADAM17 Überexpression nur eine Ausläuferlänge von ca. 240 μm gemessen werden konnte (Abb. 10A). Diese negativen Auswirkungen einer Überexpression von ADAM17 auf die Ausläuferlängen von Beta-III-Tubulin positiven Zellen können durch den Einfluss von ADAM17 auf das Zellwachstum erklärt werden. In der Literatur wurde u. a. beschrieben, dass ADAM17 durch das Spalten von TNF- α den EGF - Rezeptor aktiviert, was zum Zellwachstum, aber auch zur Proliferation und Zellmigration führt (Shah et al. 2006, Lautrette et al. 2005). Wenn die ReNcell VM Zellen durch eine Überexpression von ADAM17 weiterhin vermehrt in einem proliferierenden Zustand gehalten werden, könnte auch durch den Entzug der Wachstumsfaktoren die Differenzierung nur verlangsamt einsetzen.

Im Gegenzug dazu weist eine Herunterregulation von ADAM17 auch signifikant verkürzte Ausläufer im Vergleich zur Kontrolle auf. Diese sind aber mit ca. 110 μm nach drei Tagen Differenzierung und ca. 155 μm nach sieben Tagen Differenzierung (Abb. 10B) deutlich kürzer als bei der Überexpression von ADAM17. Die Messung dieser verkürzten Ausläufer kann durch den veränderten Phänotyp beim Silencing von ADAM17 erklärt werden. Die Ausläufer nach Transfektion mit PG-Shin2-ADAM17 ähneln Oligodentrozyten und Astrozyten (Abb. 7). Dies lässt darauf schließen, dass eine Repression von ADAM17 Effekte im Bereich der beginnenden Differenzierung hat. Zusammen mit der Reduktion der Neuronenanzahl kann es möglich sein, dass eine Herunterregulation von ADAM17 zu einer verminderten Differenzierung von ReNcell VM Zellen zu Neuronen führt.

Eine anschließende Analyse der vitalen Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Transfektionen (Abb. 11). Eine Überexpression bzw. Herunterregulation von ADAM17 zeigte jedoch bei ReNcell VM Zellen keinen Effekt auf die vitalen Zellzahlen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ADAM17 höchst wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der beginnenden Differenzierung und somit einen Einfluss auf die Differenzierung zu Neuronen hat. Dies müsste jedoch in weiteren Studien genauer untersucht werden. Darüber hinaus müsste analysiert werden, inwieweit ADAM17 für das Zellwachstum und die Proliferation in humanen Zellen verantwortlich ist, da die vorliegende Arbeit nur geringe Effekte in diesem Bereich aufzeigt.

4.3 Einfluss von ADAM22 auf die Differenzierung

ADAM22 besitzt im Gegensatz zu ADAM10 und ADAM17 keine Metalloproteasendomäne und gehört somit zu den proteolytisch inaktiven ADAM – Proteinen. In der Literatur ist beschrieben, dass ADAM22 vorrangig im Gehirn produziert wird (Sagane et al. 1998). Auch bei analysierten Hühnerembryonen konnte das Protein verstärkt über einen längeren Zeitraum im Gehirn detektiert werden (ABB. 25).

Bei ReNcell VM Zellen zeigte eine Überexpression von ADAM22 keine signifikanten Veränderungen bei der Anzahl Beta-III-Tubublin positiver Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Jedoch konnten bei proliferierenden Zellen eine Erhöhung von Beta-III-Tubulin positiven Zellen festgestellt werden, welche aber nicht signifikant war (Abb. 13A). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ADAM22 Effekte auf den Beginn der Differenzierung von humanen Vorläuferzellen besitzt. Innerhalb weiterer Untersuchungen müsste dieser Zusammenhang genauere betrachtet werden.

Bei der Untersuchung der Ausläuferlängen konnten am Tag drei signifikant verlängerte Ausläufer gemessen werden. Dabei erhöhte sich die Länge von ca. 210 µm der Kontrollzellen auf ca. 315 µm bei ADAM22 überexprimierten Zellen (Abb. 13B). Zhu et al. hat 2005 beschrieben, dass ADAM22 durch die Interaktion mit dem 14-3-3 ζ Protein u. a. für die Zellausbreitung in HEK293 Zellen verantwortlich ist. Dies könnte erklären, warum sich verlängerte Ausläufer messen lassen. Trotzdem sollte in weiteren Studien überprüft werden, warum

ADAM22 nur bei drei Tagen signifikant verlängerte Ausläufer aufweist und inwieweit ADAM22, wie in der Literatur beschrieben (Fukata et al. 2006), auch die synaptische Übertragung bei den humanen Vorläuferzellen beeinflusst.

4.4 Einfluss von ADAM23 auf die Differenzierung

Das Protein ADAM23 ist homolog zu ADAM22 (Sagane et al. 1998). Genau wie ADAM22 besitzt ADAM23 keine Metalloproteasendomäne und ist essentiell für eine normale Gehirnentwicklung und spielt somit eine wichtige Rolle in der Funktion des Nervensystems (Sagane et al. 1998, Yang et al. 2006). So wurde auch beschrieben, dass ADAM23 während der Differenzierung von Mauskarzinzellen nahe der entstehenden Neuriten auftritt (Sun et al. 2007). Effekte von ADAM23 zeigten sich auch während der Differenzierung von ReNcell VM Zellen.

Die Proteinexpression von ADAM23 steigt während der Differenzierung kontinuierlich an (Abb. 16). Zusätzlich führte eine Überexpression von ADAM23 zu einem signifikanten Anstieg von Beta-III-Tubulin positiven Zellen in der ReNcell VM Zellkultur. Nach drei Tagen Differenzierung wurde bei den Kontrollzellen ein Anstieg auf ca. 1,1 % gemessen, wohingegen die Zellkultur mit überexprimierten ADAM23 5,2 % Beta-III-Tubulin positive Zellen aufwies (Abb. 17A). Nach sieben Tagen Differenzierung konnten immer noch ca. 2,3 % Beta-III-Tubulin positive Zellen in der Hochregulationskultur gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigte eine Herunterregulation von ADAM23 in den ReNcell VM Zellen einen Abfall von Neuronen um ca. 30 %, welcher jedoch nicht signifikant war (Abb. 17B).

Um dies genauer zu betrachten, wurden Hühnerembryonen an Embryonaltag E4 mit ADAM23- bzw. Kontrollvektor transfiziert und nach zwei Tagen mit verschiedenen neuronalen Marker angefärbt. Nach Zamenhof et al. (1978) ist erst mit dem embryonalen Tag E10 der Großteil der Proliferation abgeschlossen. Demnach sollte die Beta-III-Tubulin Expression an Tag E6 sehr gering bzw. nicht detektierbar sein. Dies zeigte sich auch bei der Kontrolle, wo

keine Expression von Beta-III-Tubulin positiven Zellen (rot) in der Region der Transfektion (grün) detektierbar war. Dem entgegengesetzt waren die Ergebnisse der Analyse mit ADAM23 transfizierten Hühnchen. Hier konnte deutlich eine vermehrte Beta-III-Tubulin Expression in der transfizierten Region nachgewiesen werden (Abb. 29). Diese Ergebnisse zeigten, dass ADAM23 nicht nur während der Differenzierung auftritt, sondern sich auch positiv auf die Neuronenbildung auswirkt.

Da Sun et al. (2007) beschrieb, dass ADAM23 auch nahe der Neuriten während der Differenzierung auftritt, wurde überprüft, ob ADAM23 auch einen Effekt auf die Länge der Ausläufer zur Folge hat. Drei Tage nach der Differenzierung der ReNcell VM Zellen konnten ca. 320 μm lange Ausläufer gemessen werden, während die Länge der Kontrolle nur ca. 200 μm betrug. Nach sieben Tagen wurden bei der Kontrolle 320 μm lange Axone detektiert, während dieser Wert bei ADAM23 behandelten Zellen auf knapp 500 μm anstieg (Abb. 19A). Dieser Effekt konnte auch bei der komplett anderen Methode der Ausläuferlängendichte detektiert werden. Während bei den Ausläufermessungen immer direkt die Ausläufer der positiven Neurone gemessen wurden, wurde die Ausläuferlänge bei dieser Methode anhand der Ausläuferlängendichte berechnet. Die Werte nach drei Tagen Differenzierung zeigen mit ca. 300 μm bei ADAM23 Überexpression und ca. 170 μm bei der Kontrolle vergleichbare Werte und bestätigen somit noch einmal die direkten Messungen der Ausläufer (Abb. 20B).

Die Ausläuferlängenmessung nach einer Repression von ADAM23 in den Zellen war gegenläufig. So konnte nach drei Tagen Differenzierung nur eine Länge von ca. 100 μm und nach sieben Tagen nur knapp 170 μm gemessen werden (Abb. 19B). Diese Werte beschreiben eine neue Funktion von ADAM23. Anhand der Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass ADAM23 eine Rolle im Axonwachstum und in der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neuronen besitzt. Daraufhin wurden mehrere Proteine getestet, welche einen Einfluss auf das axonale Wachstum besitzen. Das Protein L1cam, welches in den Wachstumskegeln vorkommt und somit für das Axonwachstum verantwortlich ist (Markus et al. 2002) wurde bei einer Induktion von ADAM23 verstärkt in den Zellen produziert, wohingegen es bei einer Repression zu einer verminderten Expression kam (Abb. 21).

Um die Mechanismen genauer zu betrachten, wurden RNA-Analysen vorgenommen. Bei einer Analyse über die Veränderungen bei der Beta-III-Tubulin RNA-Produktion konnte zwar ein Anstieg der RNA, jedoch war keine signifikante Veränderung detektierbar (Abb. 18A).

Bei einer Mikroarray - Genanalyse konnten hingegen weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Tenascin-R (TNR), welches u. a. für die Neuritenformation (Volkmer et al. 1998) wichtig ist und primär im zentralen Nervensystem exprimiert wird (Xiao et al. 1997), wurde während der Differenzierung um das ca. 120 - fache hochreguliert, wohingegen das Gen in ADAM23 Silencing Zellen nur um das 60 – fache hochreguliert worden (Abb. 33). So kann davon ausgegangen werden, dass ADAM23 das Gen Tenascin-R entweder direkt oder indirekt beeinflusst und so zu einem veränderten Wachstumsverhalten führt. Des Weiteren ist das Gen Meteorin (METRNL) bei einer Stimulation von ADAM23 um ca. das 1,5 – fache bei drei Tagen Differenzierung im Gegensatz zur Kontrolle erhöht (Abb. 32). Dieses Gen ist primär für das Axonwachstum verantwortlich (Nishino et al. 2004) und erklärt somit die Ausläuferverlängerung bei einer Überexpression von ADAM23 (Abb. 19A).

Mit der Herunterregulation des Genes Etv5 kommt es in Mauszellen zu einer Abnahme der Proliferation (Tyagi et al. 2009). In der Genanalyse zeigt sich, dass bei der Kontrolle und bei ADAM23 überexprimierten Zellen die Genexpression um ca. das 40 – fache absinkt, wohingegen bei Zellen mit ADAM23 Herunterregulation die Abnahme nur ca. das 20 – fache beträgt (Abb. 33). Dies unterstützt u. a. die Aussage, dass es bei einer Herunterregulation von ADAM23 zu weniger Neuronen kommt (Abb. 17B). So würden die Zellen bei Abwesenheit von ADAM23 trotz dem Entzug der Wachstumsfaktoren im Stadium der Proliferation vermehrt verharren. Damit zeigt sich wiederum die wichtige Rolle, welche ADAM23 während der Differenzierung zu teil wird.

Neben den Genen zur Differenzierung und dem Axonwachstum sind auch apoptotische Gene zu nennen. Nach drei Tagen Differenzierung ist das apoptotische Gen Trail um das siebenfache beim Silencing von ADAM23 hochreguliert. Das Gen Caspase3 ist um das ca. 1,5 – fache hochreguliert (Abb. 32 B). Porter et al. (1999) beschrieb Trail als eines der wichtigsten apoptotischen Gene in der Zelle, welches auch die Caspase-Kaskade anstößt, was auch die

Hochregulation von Caspase3 erklärt. Bei einer Überexpression von ADAM23 kommt es hingegen nicht zu einer Hochregulation dieser Gene.

Um dieses Phänomen zu bestätigen wurden an den ReNcell VM Zellen Apoptose-Assays vorgenommen. Diese zeigten, dass es mit einer Herunterregulation von ADAM23 vermehrt zur Apoptose im Vergleich zur Kontrolle kommt. Bereits bei proliferierenden Zellen ist der Anteil von apoptotischen Zellen mit 4,5 % bereits um ein vielfaches höher als bei der Kontrolle mit nur 1,5 % (Abb. 20B). Auch nach drei Tagen Differenzierung zeigen sich mit 2,1 % apoptotischen Zellen bei der Kontrolle und 6,1 % bei einer Herunterregulation von ADAM23 knapp 3 – fach erhöhte Werte (Abb. 20 B). Bei einer anschließenden Messung der vitalen Zellen in den verschiedenen Kulturen konnte dieser Effekt ebenfalls bestätigt werden. Sowohl bei null und drei Tagen Differenzierung war die Zellzahl der vitalen Zellen bei einer Herunterregulation von ADAM23 signifikant erniedrigt (Abb. 20A).

Grundsätzlich ist ADAM23 durch sowohl die gemessenen Effekte als auch die detektierten Einflüsse auf andere Proteine und Gene ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen. So spielt ADAM23 eine wichtige Rolle während der Differenzierung in verschiedenen Zellentypen und auch im Menschen im Rahmen von Therapien eingesetzt werden.

Durch die vermehrte Differenzierung zu Neuronen könnte ADAM23 dabei helfen, Defekte bzw. Erkrankungen im Gehirn zu behandeln. Des Weiteren wäre durch die verlängerten axonalen Ausläufer eine verbesserte Regeneration im Zentralen Nervensystem möglich.

Als nächsten Schritt könnte man auch ReNcell VM nach ADAM23-Behandlung auf lebende Gewebeschnitte transplantieren, um zu überprüfen, ob die Zellen dabei auch vermehrt zu Neuronen differenzieren. Auch könnten Transplantationsexperimente an Tieren durchgeführt werden, welche dann in Zukunft nach erfolgreichen Untersuchungen auf den Menschen übertragen werden können. Ein weiterer Schritt wäre, das Protein rekombinant herzustellen, um zu überprüfen, ob eine Behandlung mit rekombinanten ADAM23 gleiche Effekte auf die Differenzierung wie eine Transfektion besitzt. Dadurch könnten später auch Patienten durch eine Proteintherapie behandelt werden.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Effekte verschiedener ADAM-Proteine auf die Differenzierung und die Ausläuferbildung beschrieben werden. Besonders durch den Kandidaten ADAM23 ist der Traum der Regeneration von Nervengewebe ein Stück näher gerückt und bei weiteren Forschungen in diesem Bereich sind vielleicht Regenerationen des Organismus wie beim Axolotl in Zukunft möglich.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine ADAM10, ADAM17, ADAM22 und ADAM23 auf ihren Einfluss auf die neuronale Differenzierung untersucht. Primär wurde die humane neuronale Vorläuferzelllinie ReNcell VM für die Analysen verwendet.

Eine Überexpression von ADAM10 in den Zellen zeigte einen positiven Einfluss auf das axonale Wachstum nach sieben Tagen der Differenzierung. Eine Repression von ADAM17 in den Zellen führte zu oligodentroyten- bzw. astrozyten-ähnlichen Ausläufen. Dies weist auf eine Funktion in der beginnenden Differenzierung hin.

Eine Hochregulation von ADAM22 führte am Tag drei der Differenzierung zu signifikant längeren neuronalen Ausläufern. Des Weiteren konnten bereits bei proliferierenden Zellen Beta-III-Tubulin positive Zellen gemessen werden, was auf eine bereits eintretende Differenzierung in diesem Stadium hindeutet.

Die Überexpression von ADAM23 in den ReNcell VM Zellen führte mit 5,2 % einerseits zu mehr als der doppelten Anzahl von Neuronen im Vergleich zur Kontrollkultur. Andererseits konnten mit 320 µm rund 60% längere Ausläufer gemessen werden. Eine Repression von ADAM23 zeigte hingegen mit verkürzten Ausläufern und einer verminderten Neuronenanzahl entgegen gesetzte Ergebnisse.

Das für das axonale Wachstum verantwortliche Protein L1cam wurde äquivalent zu ADAM23 in den ReNcell VM Zellen hoch- bzw. herunterreguliert. Eine Microarrayanalyse mit ADAM23 transfizierten Zellen zeigte, dass es bei einer Herunterregulation von ADAM23 zu einer verstärkten Apoptose in den Zellen kommt. Zusätzlich wurden verschiedene neuronale Gene, wie Tenascin-R, abgeschwächt exprimiert.

Eine Transfektion von Hühnerembryonen mit ADAM23 zeigte bereits am embryonischen Tag sechs das Vorhandensein von Beta-III-Tubulin positiven Zellen im transfizierten Bereich. Im Gegensatz dazu konnten in den Kontrollembryos nur HUC/D positive Zellen detektiert werden.

Zusammenfassend konnten weitere Erkenntnisse über den Einfluss von ADAM10, ADAM17 und ADAM22 auf die neuronale Differenzierung gewonnen werden.

Durch die Analysen des Proteins ADAM23 wurden im Hinblick auf den Einfluss der Differenzierung zu Neuronen und das axonale Wachstum neue, noch nicht bekannte Erkenntnisse gewonnen werden. Diese könnten sich vorteilhaft bei einer Stammzelltransplantation in verletztes oder degeneriertes Gewebe auswirken und so zu einer verbesserten Regeneration von Nervengewebe führen.

6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen der Auswirkungen von ADAM – Proteinen auf die Proliferation und Differenzierung von ReNcell VM Zellen und anderen Modellen. Um die Effekte noch weiter beschreiben zu können, müssten weitere Untersuchungen bei den Proteinen ADAM10, ADAM17 und ADAM22 folgen.

Weitere funktionelle Experimente zu ADAM23 könnten die Wichtigkeit dieses Proteins während der Neurogenese noch unterstreichen. Zudem müsste auch untersucht werden, inwieweit rekombinantes ADAM23 die gleichen Effekte auf Zellen aufweist. In diesem Zusammenhang müssten erste Transplantationen in einem *in vivo* System vorgenommen werden.

Durch die weitere Analyse von ADAM-Proteinen wie z.B. ADAM23 könnten therapeutische Anwendungen zur Regeneration von Nervengewebe sehr bald Wirklichkeit werden.

7 Literatur

- Alfandari** D, McCusker C, Cousin H. 2009. ADAM function in embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 20: 153-163
- Asai** M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S. 2003. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun.* 301: 231–235
- Black** RA. 2002. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 1-5
- Black** RA, White JM. 1998. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 10: 654-659
- Blobel** CP. 2002. Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflamm Res.* 51: 83-84
- Blobel** CP. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6: 32-43
- Bradke** F, Dotti CG. 2000: Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Current Biol.* 10: 1467-1470
- Cal** S, Freije JMP, López JM, Takada Y and López-Otín C. 2000. ADAM 23/MDC3, a Human Disintegrin That Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha\beta 3$ Integrin through an RGD-independent Mechanism. *Mol Biol Cell.* 11(4): 1457-1469
- Cattaneo** E, Conti L. 1998. Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res.* 53(2): 223–234
- Donato** R, Miljan EA, Hines SJ, Aouabdi S, Pollock K, Patel S, Edwards FA, Sinden JD. 2007. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci.* 8: 36
- Duffy** MJ, Lynn DJ, Lloyd AT, O'Shea CM. 2003. The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost.* 89: 622–631

- Dunbar** LA, Caplan MJ. 2001. Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺- and H⁺, K⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* 276 (32): 29617–29620
- Edwards** DR, Handsley MM, Pennington CJ. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 29:258-289
- Evans** SM, Janson AM, Nyengaard JR. 2004. Quantitative methods in neuroscience. Oxford Press.
- Fambrough** D, Pan D, Rubin GM and Goodman CS. 1996. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(23): 13233–13238
- Flynn** KC, Pak CW, Shaw AE, Bradke F, Bamburg JR. 2009. Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Dev Neurobiol.* 69 (12): 761–779
- Freeman** RS, Burch RL, Crowder RJ, Lomb DJ, Schoell MC, Straub JA and Xie L. 2004. NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand?. *Progress in Brain Res.* 146: 111-126
- Fukata** Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M. 2006. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science.* 313: 1792–1795
- Gilbert** RJ, McKeon RJ, Darr A, Calabro A, Hascall VC and Bellamkonda RV. 2005. CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension. *Mol Cell Neurosci.* 29 (4): 545-558
- Gundersen** HJG. 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc.* 111: 219-223
- Gordon** MD, Nusse R: 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281(32): 22429-22433
- Hall** RJ, Erickson Ca. 2003. ADAM10: an active metalloprotease expressed during avian epithelial morphogenesis. *Dev Biol* 256:146-159
- Hartmann** D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L,

- Lübke T, Illert AL, von Figura K, Saftig P. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for a-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Gen.* 11: 2615–2624
- Hatta** K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M. 1987. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol.* 120:215-227
- Hattori** M, Osterfield M, Flangan JG. 2000. Regulated cleavage of a contactmediated axon repellent. *Science*, 289, S. 1360-1365.
- Hoffrogge** R., Mikkat S., Scharf C., Beyer S., Christoph H., Pahnke J., Mix E., Berth M., Uhrmacher A., Zubrzycki I., Miljan E., Völker U., Rolfs A. 2006. 2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM). *Proteomics.* 6: 1833-1847
- Horiuchi** K, Zhou H-M, Kelly K, Manova K, Blobel CP. 2005. Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins $\beta 1$ and $\beta 2$. *Dev Biol.* 283:459 – 471
- Hübner** R, Schmöle AC, Liedmann A, Frech MJ, Rolfs A, Luo J. 2010. Differentiation of human neural progenitor cells regulated by Wnt-3a. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 400: 358-362
- Johansson** CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM and Frisén J. 1999. Neural Stem Cells in the Adult Human Brain. *Exp Cell Res.* 253(2): 733-736
- Kenny** PA, Bissel MJ. 2007. Targeting TACE-dependent EGFR-ligand shedding in breast cancer. *J clinic invest.* 117: 337-345
- Kieseier** BC, Pischel H, Neuen-Jacob E, Tortellotte WW, Hartung H-P. 2003. ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS. *Glia.* 42: 398-405
- Kuhn** HG, Palmer TD and Fuchs E. 2001. Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *European Arch Psych Clin Neurosci.* 251: 152-158
- Laemmli** UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-5

- Lautrette** A, Li S, Alili R, Sunnarborg SW, Burtin M, Lee DC, Friedlander G, Terzi F. 2005. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nature Medicine*. 11: 867- 874
- Le Gall** SM, Bobe P, Reiss K, Horiuchi K, Niu X-D, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, Blobel CP. 2009. ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for membrane Proteins as Transforming Growth Factor α , L-selectin, and Tumor Necrosis Factor. *Mol Biol Cell*. 20(6): 1785-1794
- Leighton** PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, Lu X, Pinson K, Scherz P, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 2001. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature*. 410: 174–179
- Li** Y, Brazzell J, Herrera A, Walcheck B. 2006. ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood* 108 (7): 2275–2279
- Lin** J, Luo J, Redies C. 2008. Differential expression of five members of the ADAM family in the developing chicken brain. *Neuroscience* 157: 360-375
- Lin** J, Yan X, Markus A, Redies C, Rolfs A, Luo J. 2010. Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord. *Dev Dyn*. 239:1246-54
- Mandel** M, Higa A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*. 53(1): 159-62
- Markus** A. Patel TD, Snider WD. 2002. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol*. 12(5): 523-31
- Menger** B, Vogt PM, Kuhbier JW, Reimers K. 2010. Applying amphibian limb regeneration to human wound healing: a review. *Ann Plast Surg*. 65(5): 504-10
- Mitsumoto** H. 1985. Axonal regeneration in wobbler motor neuron disease: Quantitative histologic and axonal transport studies. *Muscle and Nerve*. 8(1): 44-51
- Morgan** PJ, Ortinau S, Frahm J, Krüger N, Rolfs A, Frech MJ. 2009. Protection of neurons derived from human neural progenitor cells by veratridine. *Neuroreport*. 20: 1225-1229
- Neuner** R, Cousin H, McCusker C, Coyne M, Alfandari D. 2009. *Xenopus* ADAM19 is involved in neural, neural crest and muscle development. *Mech Dev*. 126: 240-255

- Nishino J**, Yamashita K, Hashiguchi H, Fujii H, Shimazaki T and Hamada H. 2004. Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO Journal*. 23(9): 1998-2008
- Pan D**, Rubin GM. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediated lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*. 90: 271-280
- Peters S**, Mix E, Bauer P, Weinelt S, Schubert B, Knoblich R, Böttcher T, Strauss U, Pahnke J, Cattaneo E, Wree A und Rolfs A. 2004. Wnt-5a expression in the rat neuronal progenitor cell line ST14A. *Exp Brain Res*. 158: 189-195
- Pfaffl MW**. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29 e45
- Porter AG** and Jänicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and Diff*. 9(2): 99-104
- Recknor JB** and Mallapragada SK. 2006. Nerve Regeneration: Tissue Engineering Strategies, in *The Biomedical Engineering Handbook: Tissue Engineering and Artificial Organs*, J.D. Bronzino, Editor., Taylor & Francis: New York
- Reiss K**, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and β -catenin nuclear signalling. *EMBO J*. 24(4): 742-752
- Sagane K**, Ohya Y, Hasegawa Y, Tanaka I. 1998. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem J*. 334: 93–98
- Sagane K**, Hayakawa K, Kai J, Hirohashi T, Takahashi E, Miyamoto N, Ino M, Oki T, Yamazaki K, Nagasu T. 2005. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neurosci*. 6: 33
- Sahin U**, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.*, 164: 769-779
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Schimmelpfeng K, Gogel S, Klambt C. 2001. The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech.Dev.* 106: 25-36.

Schlöndorff J, Blobel CP. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci.* 112: 3603-3617

Schmitt O, Eggers R, Mendoza A, Szabo K, Feyerabend T, Weiss C, Kühnel W. 1999. Stereologic evaluation of the vasculature in a MX1 xenotransplanted tumour model after combinations of treatment with ifofamide, hypertermia and irradiation. *Int J Hypertermia.* 15: 237-250

Schmöle AC, Brennführer A, Karapetyan G, Jaster R, Pews-Davtyan A, Hübner R, Ortinau S, Beller M, Rolfs A, Frech MJ. 2010. Novel indolylmaleimide acts as GSK-3beta inhibitor in human neural progenitor cells. *Bioorg Med Chem.* 18: 6785-6795

Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7-30

Shah BH, Catt KJ. 2006. TACE-dependent EGF receptor activation in angiotensin-II-induced kidney disease. *Trends Pharmac Sci.* 27: 235-237

Stabenfeldt SE, Garcia AJ and LaPlaca MC. 2006. Thermoreversible laminin-functionalized hydrogel for neural tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Res.* 77: 718-725

Sternlicht MD, Sunnarborg SW. 2008. The ADAM17-amphiregulin-EGFR Axis in Mammary Development and Cancer. *J Mam Gland Bio Neopla.* 13: 181-194

Sun Y, Wang Y, Zhang J, Tao J, Wang C, Jing N, Wu C, Deng K, Qiao S. 2007. ADAM23 Plays Multiple Roles in Neuronal Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma cells. *Neurochem Res.* 32: 1217-1223

Sun YP, Deng KJ, Wang F, Zhang J, Huang X, Qiao S, Zhao S. 2004. Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. *Gene.* 325: 171-178

Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, Hosoda F,

- Hirohashi S, Ohki M, Inazawa J. 2005. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. *Oncogene*. 24(54): 8051-60
- Tyagi** G, Carnes K, Morrow C, Kostereva NV, Ekman GC, Meling DD, Hostetler C, Griswold M, Murphy KM, Hess RA, Hofmann M-C and Cooke PS. 2006. Loss of Etv5 Decreases Proliferation and RET Levels in Neonatal Mouse Testicular Germ Cells and Causes an Abnormal First Wave of Spermatogenesis. *Biol Reprod*. 81(2): 2 258-266
- Volkmer** H, Zacharias U, Nörenberg U, Rathjen FG. 1998. Dissection of complex molecular interactions of neurofascin with axonin-1, F11, and tenascin-R, which promote attachment and neurite formation of tectal cells. *J. Cell Biol*. 142 (4): 1083–93
- Weber** K und Osborn M. 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem*. 244: 4406-4412.
- White** JM. 2003. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*. 15:598-606
- Wolfsberg** TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG, White JM. 1995. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol*. 169:378-383
- Xiao** ZC, Taylor J, Montag D, Rougon G, Schachner M. 1997. Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11. *Eur J Neurosci*. 8 (4): 766–82.
- Yan** X, Lin J, Wang H, Markus A, Wree A, Rolfs A, Luo J. 2010. Regional expression of the ADAMs in developing chicken cochlea. *Dev Dyn*. 239(8): 2256-65
- Yang** P, Baker KA, Hagg T. 2006. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog Neurobiol* 79:7 3-94
- Zamenhof** S, 1976. Stimulation of Brain Development in Chick Embryo by Elevated Temperature. *Roux Arch Dev Biol*. 180: 1-8
- Zheng** Y, Saftig P, Hartmann D, Blobel CP. 2004. Evaluation of the contribution of different ADAMs to TNF α shedding and of the function of the TNF α ectodomain in ensuring selec-

tive stimulated shedding by the TNF α convertase (TACE/ADAM17). J Biol Chem. 279: 42898–42906

Zhu P, Sang Y, Xu H, Zhao J, Xu R, Sun Y, Xu T, Wang X, Chen L, Feng H, Li C, Zhao S. 2005. ADAM22 plays an important role in cell adhesion and spreading with the assistance of 14-3-3. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331 (4): 938–46

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

In diesem Verzeichnis befinden sich alle Abbildungen, welche nicht durch die Untersuchungen in dieser Arbeit entstanden, sondern von anderen Quellen übernommen wurden.

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Seite	Titel
Cover	Cover	Immunfärbung von ReNcell VM Zellen nach sieben Tagen Differenzierung
1	08	Blobel CP. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 32-43
2	35/53	http://www.fotosearch.de/lifeart/tieranatomie/LIF146 (04.07.2010)
3	41	ReNcell VM Zellen nach unterschiedlichen Stadien der Differenzierung
4	42	ReNcell VM Zellen nach ADAM10 Transfektion bei unterschiedlichen Tagen der Differenzierung
5	42	Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM10 Transfektion mit Hilfe von FACS-Analyse, Ausläuferlängenmessung und Zellzahlmessung
6	43	Untersuchung von zellulären Subfraktionen der ReNcell VM Zellen nach ADAM10 Transfektion mit Hilfe von einer Western Blot Analyse
7	44	Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM17 Transfektion
8	45	Untersuchung von ReNcell VM Zellen via Western Blot mit polyklonalen ADAM17 Antikörper
9	45	FACS-Analyse von ReNcell VM Zellen nach ADAM17 Transfektion
10	46	Faserlängenmessung von ReNcell VM Zellen nach ADAM17 Transfektion mit Hilfe der Keyence Software bei Hochregulation (A) und Abregulation (B) von ADAM17
11	46	Messung vitaler Zellen nach 0, 3 und 7 Tagen der Differenzierung und verschiedenen Transfektionen mit ADAM17
12	47	Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM22 Transfektion
13	47	FACS Analyse von ReNcell VM Zellen nach ADAM22 Transfektion und Ausläufermessung via Keyence Software
14	48	Messung vitaler Zellen nach 0, 3 und 7 Tagen der Differenzierung und verschiedenen Transfektionen mit ADAM22

15	48	Untersuchung von ReNcell VM Zellen nach ADAM23 Transfektion mit Hilfe von Western Blot Analyse
16	49	Untersuchung von ReNcell VM Zellen via Western Blot mit polyklonalem ADAM23 Antikörper
17	49	FACS Analyse von ReNcell VM Zellen nach ADAM23 Transfektion
18	50	Beta-III-Tubulin RNA Expression von ReNcell VM Zellen mit Hilfe von PCR (A) Vergleich Methoden Ausläuferlängenmessung (B)
19	50	Faserlängenmessung von ReNcell VM Zellen nach ADAM23 Transfektion mit Hilfe der Keyence Software bei Überexpression (A) und Repression (B)
20	51	Zellzahl- und Apoptosemessung von ADAM23 transfizierten Zellen
21	52	Expression von L1cam nach verschiedenen Transfektionen während der Differenzierung
22	52	Identifikation der Spezifität verschiedener ADAM-Antikörper
23	54	ADAM10 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos
24	56	ADAM17 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos
25	57	ADAM22 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos
26	58	ADAM23 Expressionsanalyse im Gehirn eines Hühnerembryos
27	59	Untersuchung von ST14A Zellen mit verschiedenen ADAM-Antikörpern bei Proliferation und Differenzierung
28	60	Mit ADAM23 Überexpressionsvektor transfizierte Hühnerembryos
29	61	Cerebellum eines Hühnerembryo an Embryonaltag 6 nach Beta-III-Tubulin Färbung
30	62	Cerebellum eines Hühnerembryo an Embryonaltag 6 nach HUC/D Färbung
31	63	Microarray mit ReNcell VM Zellen
32	64	Auswertung der Microarrays mit ReNcell VM Zellen nach 3 Tagen Differenzierung
33	65	Auswertung der Microarrays mit ReNcell VM Zellen zwischen 0 und 3 Tagen Differenzierung

Tabellenverzeichnis

Tab.	Seite	Titel
1	20	Primärantikörper
2	21	Sekundärantikörper
3	21/22	Oligonucleotide für Sequenzierung
4	22	Oligonucleotide für Klonierung
5	23	Klonierungs-, Reportervektoren

9 Anhang

Veröffentlichungen:

- 2011: Quantitative and dynamic expression profile of latent and active forms of the regional ADAM proteins during chicken brain development. **Markus A**, Yan X, Rolfs A, Luo J. in Druck (Cell Mol Biol Lett)
- 2011: Regional Expression of ADAM19 during Chicken Embryonic Development. Xin Yan, Juntang Lin, **Annett Markus**, Arndt Rolfs, Jiankai Luo. Dev Growth Differ. 2011 Apr; 53(3): 333-346
- 2010: Regional expression of the ADAMs in developing chicken cochlea. Yan X, Lin J, Wang H, **Markus A**, Wree A, Rolfs A, Luo J. Dev Dyn. 2010 Aug; 239(8): 2256-2265
- 2010: Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord. Lin J, Yan X, **Markus A**, Redies C, Rolfs A, Luo J. Dev Dyn. 2010 Apr; 239(4): 1246-1254
- 2009: Cadherin-20 expression by motor neurons is regulated by sonic hedgehog during spinal cord development. Luo J, Ju MJ, Lin J, Yan X, **Markus A**, Mix E, Rolfs A, Redies C. Neuroreport. 2009 Mar 4; 20(4): 365-370

Manuskripte

- 2011: ADAM17 overexpression promotes angiogenesis by increasing blood vessel sprouting and pericyte number during brain microvessel development. Lin J; Lemke C; Redies C; Yan X, **Markus A**, Mix E, Rolfs A, Luo J. submitted (J Dev Biol)
- 2011: ADAM23 promotes neurogenesis and fiber growth during differentiation of human neural progenitor cells. **Markus A**, Koczan D, Schmitt O, Yan X, Frech MJ, Wree A, Rolfs A, Luo J. Manuskript

Poster:

- 09/2010 ADAM23 promotes neurogenesis and fiber growth during differentiation of human neural progenitor cells
A. Markus, X. Yan, M.J. Frech, A. Wree, A. Rolfs und J. Luo
Springschool for regenerative medicine, Stockholm, Schweden
- 09/2010 Regional expression of the ADAMs in developing chicken cochlea.
Yan X, Lin J, Wang H, **Markus A**, Wree A, Rolfs A, Luo J.
Springschool for regenerative medicine, Stockholm, Schweden
- 11/2009 Effect of ADAM17 on the Differentiation of Human Neural Progenitor Cells
A. Markus, X. Yan, A. Rolfs und J. Luo
Springschool for regenerative medicine, Prague, Czech Republic
- 06/2009 Influence of ADAM23 on the Neuronal Differentiation of a Human Fetal Neural Progenitor Cell Line
A. Markus, X. Yan, S. Ortinau, A. Rolfs und J. Luo
Springschool for regenerative medicine, Odense, Denmark
- 10/2008 Chicken embryos – a good model for biological developmental study
A. Markus, X. Yan, J. Luo and A. Rolfs
Springschool for regenerative medicine, Berlin, Germany
Annett Markus

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei Prof. Rolfs bedanken, welcher mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion an seinem Institut durchzuführen und auch dafür, dass er mir in den letzten Monaten meiner Arbeit geholfen hat, die verbleibenden Experimente gut zu strukturieren.

Auch möchte ich Prof. Weiss danken, dass er sich meiner Arbeit mit angenommen und mir in diesem Zusammenhang ebenfalls Tipps für die Promotion gegeben hat.

Prof. Schmitt von der Anatomie und Dr. Koczan möchte ich danken. Bei beiden erhielt ich die Möglichkeit Teile meiner Forschung durchzuführen. Des Weiteren haben Sie mir bei der Auswertung meiner Ergebnisse geholfen.

Zusätzlich möchte ich mich bei allen AKos-Mitarbeitern für die schöne Zeit bedanken. Moritz möchte ich sehr danken, dass er sich Zeit genommen hat, meine Arbeit zu kontrollieren und dafür, dass er mir auch immer gute Tipps und Hinweise gegeben hat.

Besonders möchte ich mich bei Jan, Rayk und Peter bedanken, welche mir immer sehr aufbauend bei meinen experimentellen Problemen geholfen haben.

Auch bei Xin möchte ich mich für die gemeinsame Promotionszeit bedanken, ich werde nie die Höhen und Tiefen vergessen, welche wir gemeinsam während unserer Promotion erlebt haben.

Jiankai möchte ich für die Betreuung und in diesem Zusammenhang auch für die Mithilfe und Kontakte bei den veröffentlichten Artikeln danken.

Ellen und Norman möchte ich sehr für ihre technische Unterstützung und die Vorbereitung der Zellen danken.

Noch einen großen Dank an Caro, dass sie mir mit ihrer guten Laune auch an den stressigen Tagen im Labor ein Lächeln auf die Lippen gezaubert hat.

Einen sehr großen Dank möchte ich meinen Eltern widmen, welche mich während meiner gesamten Studienzeit und der Promotionszeit immer moralisch und finanziell zur Seite standen und mich bei allen Höhen und Tiefen immer unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Freund Mathias bedanken, weil er besonders in der stressigen Endphase und während des Schreibens meiner Arbeit große Geduld bewies. Danke für Deine liebevolle Unterstützung.